

Determinação do comportamento alimentar de
percevejos pentatomídeos por meio da técnica
de EPG (Gráfico de Penetração Elétrica)



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Trigo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 115

Determinação do comportamento alimentar de percevejos pentatomídeos por meio da técnica de EPG (Gráfico de Penetração Elétrica)

*Antônio Ricardo Panizzi
Tiago Lucini*

***Embrapa Trigo
Passo Fundo, RS
2019***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Trigo
Rodovia BR 285, Km 294
Caixa Postal 3081
Telefone: (54) 3316-5800
Fax: (54) 3316-5802
99050-970 Passo Fundo, RS
<https://www.embrapa.br/fale-conosco>

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Trigo

Presidente
Leila Maria Costamilan

Membros
Alberto Luiz Marsaro Júnior, Alfredo do Nascimento Junior, Anderson Santi, Genei Antonio Dalmago, Sandra Maria Mansur Scagliusi, Tammy Aparecida Manabe Kiihl, Vladirene Macedo Vieira

Normalização bibliográfica
Maria Regina Cunha Martins (CRB 10/609)

Tratamento das ilustrações e editoração eletrônica
Fátima Maria De Marchi e Márcia Barrocas Moreira Pimentel

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Capa
Fátima Maria De Marchi

Foto da capa
Tiago Lucini

1ª edição
1ª impressão 2019: 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Trigo

Panizzi, Antônio Ricardo.

Determinação do comportamento alimentar de percevejos pentatomídeos por meio da técnica de EPG (Gráfico de Penetração Elétrica). / Antônio Ricardo Panizzi, Tiago Lucini. – Passo Fundo : Embrapa Trigo, 2019.
53 p. – (Documentos / Embrapa Trigo, ISSN 1516-5582 ; 115)

1. Inseto – Praga agrícola – Percevejo. 2. Gráfico de penetração elétrica.
I. Lucini, Tiago. II. Título. III. Série.

Maria Regina Cunha Martins (CRB 10/609) CDD: 632.7
© Embrapa, 2019

Autores

Antônio Ricardo Panizzi

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Entomologia, pesquisador da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

Tiago Lucini

Engenheiro-agrônomo, Dr. em Entomologia, bolsista de pós-doutorado, ex-estagiário da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

Agradecimentos

Os resultados aqui apresentados são fruto de diversos projetos de pesquisa desenvolvidos pelo pesquisador A. R. Panizzi e por alunos de doutorado da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em especial Tiago Lucini, e por estagiários de Iniciação Científica desde 2011, com apoio da Embrapa Trigo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Esse documento foi impresso com recursos do projeto do Edital Universal 2016 do CNPq intitulado ‘Percevejos em cereais de inverno: bioecologia e danos e monitoramento eletrônico da alimentação pelo uso do EPG’, processo número 400551/2016-0.

Os autores e a editora agradecem as seguintes fontes de imagens, pela permissão de uso recebida:

A Sociedade Entomológica do Brasil, pelas Figuras 3, 8, 9, 17, 20 e 28B; *Entomological Society of America*, pelas Figuras 4A e 5; *American Phytopathological Society*, pela Figura 6; Sociedade Brasileira de Entomologia, pela Figura 7D; *Oxford University Press*, pelas Figuras 15, 24A, 24B, 25, 26B e 28A; e *John Wiley and Sons*, pelas Figuras 19 e 27.

Apresentação

É com enorme prazer que fazemos a apresentação dessa Série Documentos dedicada a expandir o conhecimento atual sobre o uso da tecnologia conhecida por Gráfico de Penetração Elétrica, ou Eletropenetrografia, abreviada mundialmente como EPG. Os estudos tiveram início na Embrapa Trigo a partir de 2011, com a chegada do entomologista Dr. Antônio Ricardo Panizzi. Especialista em percevejos, importou, ao longo dos anos, três equipamentos e desenvolveu, com seus estagiários, uma *expertise* pioneira para monitorar as atividades alimentares de percevejos-pragas de grandes culturas, como a soja, o milho e o trigo.

A Embrapa como um todo prima, entre outras atividades, por inovar, e inovação é uma das principais palavras de ordem do mundo moderno. O estudo dos percevejos-pragas das grandes culturas citadas atingiu um patamar de conhecimento que se estabilizou nos últimos anos. Insetos com hábitos alimentares sofisticados têm desafiado o conhecimento humano no sentido de desenvolver tecnologias de manejo que sejam ecologicamente compatíveis e sustentáveis ao longo do tempo.

Agora, com a viabilização do uso do EPG para monitorar as atividades alimentares veladas dos percevejos no interior das plantas, novas perspectivas se abrem, visando a avançar o conhecimento atual e a desvendar novas tecnologias de manejo das espécies-pragas. Documentos como esse, que ora apresentamos, constituem-se em avanços concretos do conhecimento em Entomologia com potencial real de gerar estratégias de manejo modernas compatíveis com a sociedade contemporânea

Osvaldo Vasconcellos Vieira
Chefe-Geral da Embrapa Trigo

Sumário

1. Introdução	11
2. Técnica de EPG (eletropenetrografia) e seu funcionamento	13
2.1 Caracterização das ondas e de seus componentes elétricos	16
3. Aparelho bucal e estratégias de alimentação dos percevejos (Pentatomidae)	21
4. Preparação (aramização) dos percevejos para uso no EPG	24
5. Ajustes do software de gravação (Windaq)	29
6. Comportamentos alimentares de percevejos e suas respectivas ondas elétricas	32
6.1 Vasos do xilema	36
6.2 Vasos do floema	38
6.3 Células do parênquima	40
6.4 Endosperma das sementes	43
6.5 Retirada dos estiletes do tecido vegetal após as atividades alimentares	44
7. Correlação das ondas com seus locais de alimentação	46
7.1 Secreção de seiva	46

7.2 Análise química de excretas.....	47
7.3 Uso de dieta artificial	47
7.4 Histologia de tecidos	47
8. Considerações finais	50
9. Referências	51

1. Introdução

Os percevejos são representados pela ordem Hemiptera (Subordem Heteroptera) e a maioria de suas espécies suga as plantas, o que os tornam insetos de elevada importância econômica, por se tratarem de pragas de inúmeras culturas economicamente importantes para o homem. Os danos ocasionados por estes insetos podem ser diretos, por meio da ingestão dos conteúdos celulares de partes reprodutivas (sementes) ou vegetativas (hastes e folhas), pelo efeito da destruição dos tecidos por meio mecânico (dano físico) e, principalmente, por meios químicos (dano químico), causados pela ação de enzimas digestivas (Panizzi; Silva, 2012). Durante suas atividades alimentares, os percevejos inserem seus estiletes (aparelho bucal) nos tecidos vegetais para retirar os nutrientes. Como resultado, podem inutilizar a semente, reduzindo sua viabilidade, e originando plântulas com baixo vigor (Panizzi; Silva, 2012).

Em virtude da grande importância dos percevejos como pragas agrícolas, o conhecimento de seu comportamento alimentar é de grande valia para determinarem-se os locais explorados pelos insetos durante sua alimentação, por quanto tempo permanecem em cada um desses tecidos e quais são as atividades realizadas em cada local. Isso permitirá compreender melhor o processo alimentar para buscar ferramentas para tentar reduzir seus danos nas plantas. Entretanto, diferente de insetos mastigadores, com os quais é possível observar-se o comportamento alimentar visualmente, nos insetos sugadores tais atividades são de difícil observação, principalmente as mais relevantes. Isso porque todas ocorrem internamente nos tecidos das plantas (Walker, 2000); portanto, técnicas especializadas são necessárias para avaliar essas atividades.

Dentre essas técnicas, o monitoramento eletrônico da alimentação, mais conhecido como EPG (Gráfico de Penetração Elétrica, ou Eletropenetrografia) tem permitido aos pesquisadores desvendar com precisão as atividades dos estiletes realizadas por insetos sugadores internamente nos tecidos de plantas durante suas atividades alimentares. Nesta técnica, uma corrente elétrica circula através de um circuito elétrico simples, do qual a planta e o inseto sugador fazem parte. No momento em que o inseto insere os estiletes no tecido vegetal eletrificado, o circuito é fechado e as diferentes

atividades alimentares são gravadas na forma de ondas elétricas (Tjallingii, 1978; Walker, 2000). Nesse gráfico, é possível correlacionar as ondas com atividades específicas dos estiletes nos tecidos vegetais (Tjallingii, 1985), além de determinar a posição dos estiletes no tecido vegetal via estudos histológicos (Lucini; Panizzi, 2016).

Com o advento dessa técnica, o comportamento alimentar dos insetos sugadores passou a ser muito estudado e muitos trabalhos começaram a ser produzidos. Dados da literatura (Figura 1) mostram essa evolução, com grande destaque para os últimos 10 anos, quando o número de trabalhos publicados aumentou significativamente.

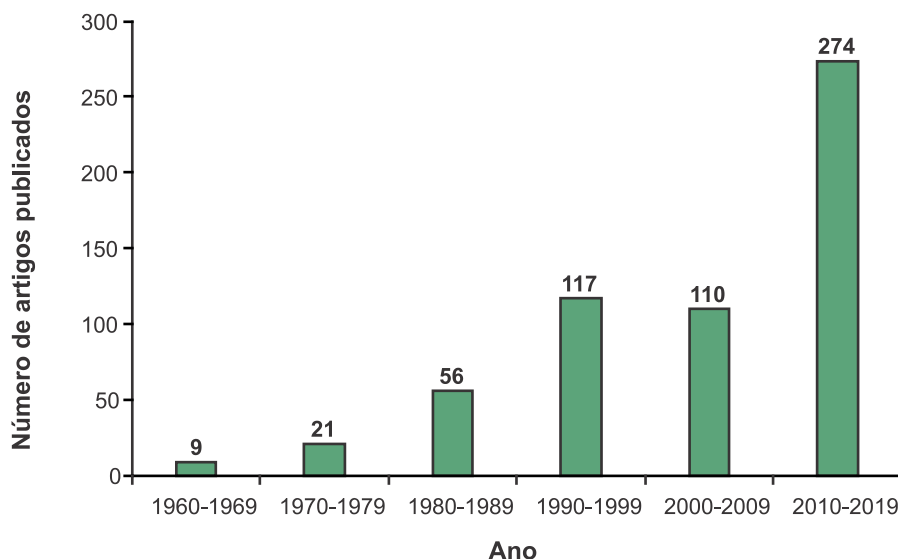


Figura 1. Número de artigos científicos publicados com emprego da técnica de Gráfico de Penetração Elétrica (EPG) no estudo do comportamento alimentar de insetos sugadores fitófagos, ao longo dos anos.

Fonte: Scopus (2019); Web of Science (2019).

Entretanto, considerando todos os dados publicados, os trabalhos têm focado, principalmente, em dois tipos de insetos: pulgões e cigarrinhas, os quais abrangem quase 80% das publicações. No caso de percevejos (Pentatomidae), o uso do EPG para avaliar seu comportamento alimentar

ainda é incipiente. O primeiro trabalho com um pentatomídeo foi publicado em 2016 (Lucini; Panizzi, 2016), mas o número vem aumentando ao longo dos anos (Lucini; Panizzi, 2018a). Logo, o uso do EPG como ferramenta no estudo de percevejos abre um horizonte enorme de alternativas e de linhas de pesquisa que podem ser estudadas.

Nessa publicação serão apresentados e discutidos os seguintes pontos: 1) o que é a técnica de EPG e como funciona; 2) aparelho bucal e estratégias de alimentação utilizadas pelos percevejos; 3) técnica de preparo dos percevejos (aramização) para uso no EPG; 4) ajuste do software de gravação; 5) dados de pesquisa sobre os comportamentos alimentares de percevejos e suas respectivas ondas elétricas; e 6) formas para correlacionar as ondas elétricas com as atividades (salivação, ingestão) e a posição dos estiletes no tecido vegetal.

2. Técnica de EPG e seu funcionamento

Essa tecnologia foi criada na década de 1960, por dois pesquisadores norte-americanos que construíram o primeiro sistema de monitoramento eletrônico (1ª geração) que permitiu monitorar detalhadamente as atividades alimentares de pulgões. Originalmente, foi nomeado de sistema de monitoramento elétrico (EMS), aplicando-se uma corrente alternada (AC) (McLean; Kinsey, 1964). Logo, essa tecnologia ganhou grande importância no âmbito dos estudos sobre o processo alimentar de insetos sugadores, principalmente de pulgões. Em 1978, o pesquisador holandês Freddy Tjallingii fez melhorias na técnica e desenvolveu um novo monitor de gravação, chamado monitor GIGA 8 (Figura 2A) (2ª geração), com maior sensibilidade e qualidade de gravação, aplicando uma corrente direta (DC) (Tjallingii, 1978). Esse novo sistema passou a ser conhecido como gráfico de penetração elétrica (EPG). O monitor GIGA 8 ainda é comercializado e, devido a suas características elétricas, é mais indicado para insetos com pequeno tamanho corporal, como pulgões, mosca-branca e psílídeos.

Em 2009, os pesquisadores Elaine A. Backus e William H. Bennett desenvolveram um “monitor universal” (3ª geração), o qual aplicava ambas as correntes elétricas, AC e DC. Além disso, esse monitor permitiu aplicar diferentes níveis de impedância de entrada (variando de 10^6 Ohms até

10¹³ Ohms) (Backus; Bennett, 2009) (Figura 2B), o que é fundamental na caracterização de uma biblioteca de ondas para um determinado inseto. Esse equipamento pode ser usado em qualquer tipo de inseto sugador. No caso de percevejos e de outros insetos grandes, esse equipamento é o mais indicado.

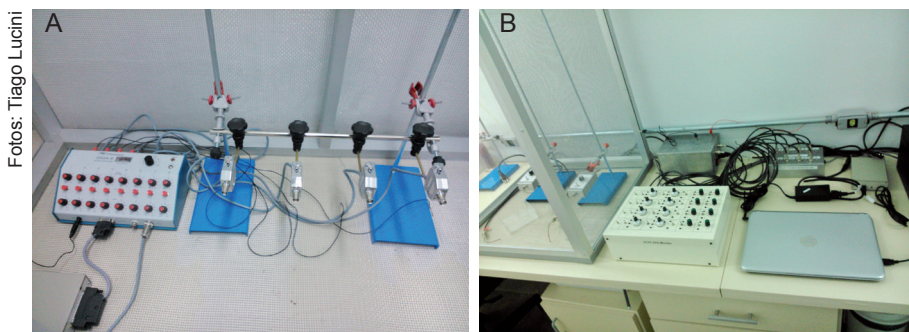


Figura 2. Monitores de Gráfico de Penetração Elétrica (EPG) usados na gravação do comportamento alimentar de insetos sugadores: (A) monitor GIGA 8 e (B) monitor AC-DC.

A técnica do EPG é empregada no estudo das interações entre insetos sugadores, principalmente fitófagos, e seus hospedeiros. Nessa interação, o equipamento monitora o comportamento alimentar desses insetos e cria ondas elétricas que estão correlacionadas com as atividades dos estiletes do inseto nos diferentes tecidos vegetais. O termo “comportamento alimentar” envolve inúmeras atividades, tais como locomoção exploratória sobre a superfície do hospedeiro, inserção e penetração dos estiletes, atividades associadas à salvação e à ingestão de fluídos e com a retirada dos estiletes do tecido (Tjallingii, 2000).

O monitor de EPG é composto basicamente por um box de controle contendo uma fonte de voltagem, dois cabos (eletrodos de cobre) e um amplificador (também chamado de EPG probe) (Figura 3).

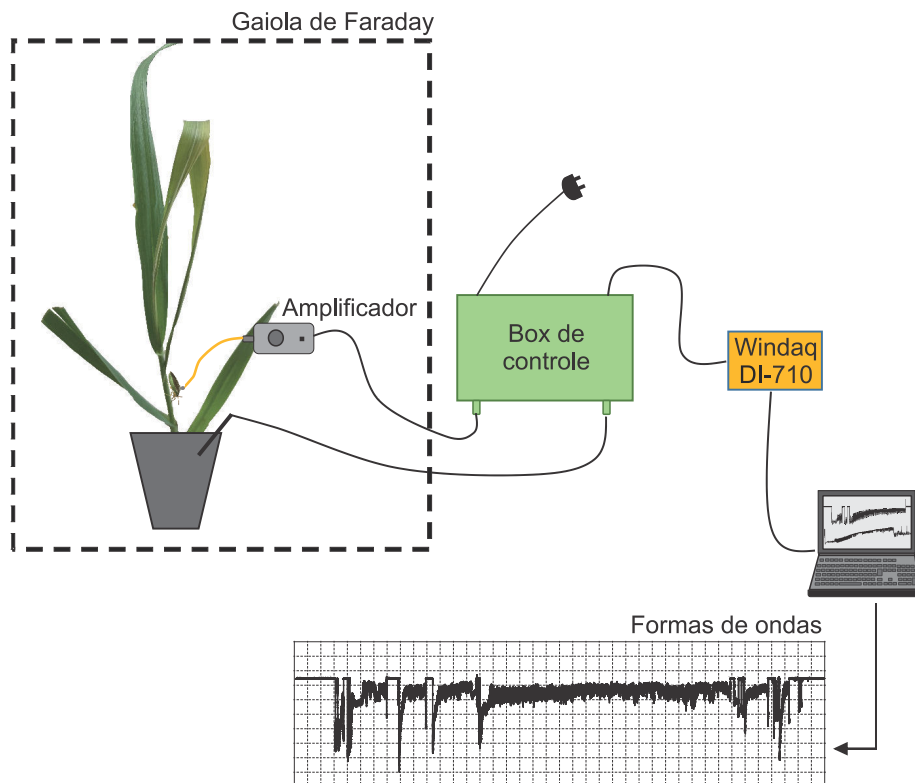


Figura 3. Esquema do circuito elétrico de um canal de Gráfico de Penetração Elétrica (EPG), mostrando seus componentes e as ondas obtidas após a gravação.

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2018a).

Os amplificadores, as plantas e os insetos ficam dispostos dentro de uma gaiola de Faraday para proteger o sistema contra perturbações elétricas externas, pois este é extremamente sensível a qualquer alteração elétrica (Walker, 2000). Pode-se trabalhar com uma ou duas gaiolas, e o tamanho varia de acordo com a necessidade dos estudos (ex.: tamanho das plantas a serem utilizadas, necessidade de uso de suportes, etc.). A parte frontal da gaiola pode ser aberta ou fechada com porta. Recomenda-se usar duas gaiolas, com a parte frontal aberta, cada uma com as seguintes dimensões: altura 90 cm, largura 80 cm e profundidade 60 cm.

O princípio básico da técnica é fazer, do inseto sugador e de uma planta hospedeira, parte de um circuito elétrico simples ou de mensuração, onde uma

determinada corrente elétrica circula (Tjallingii, 1978) (Figura 3). Para formar esse circuito elétrico, um dos cabos (eletrodo da planta) é inserido no solo em que a planta se encontra, ou também pode ser inserido diretamente na planta. O outro cabo (eletrodo do inseto) é fixado no corpo do inseto sugador. Para isso, um pedaço fino e flexível de fio de ouro é colado no eletrodo de cobre, e em seguida esse fio de ouro é fixado no dorso do inseto sugador usando cola de prata condutiva, que então é ligado ao monitor (Figura 3) (Walker, 2000).

Uma vez montado o circuito elétrico, quando o inseto insere seus estiletes no tecido vegetal eletrificado, o circuito é fechado e um fluxo elétrico circula pela interface inseto-planta. A partir daí, é possível monitorar as atividades dos estiletes nos tecidos vegetais, pois essas atividades promovem alterações nos componentes elétricos que são capturadas pelo monitor EPG e em seguida convertidas e registradas em forma de ondas (Walker, 2000) pelo equipamento chamado de Windaq (modelo DI-710 UHD) (Figura 3).

2.1 Caracterização das ondas e de seus componentes elétricos

Os tipos de onda são descritos e diferenciados de acordo com sua forma e seus componentes elétricos: frequência (Hz), amplitude relativa (%), nível de voltagem (intra ou extracelular, esta mais importante para insetos pequenos) e origem elétrica (resistência: R, e força eletromotriz: emf) (Tjallingii 1978; 1985). A determinação da origem elétrica ou do componente elétrico é extremamente importante na identificação dos significados biológicos das ondas.

As ondas estão associadas a diferentes atividades dos estiletes nos tecidos vegetais, sendo três principais: 1) inserção e penetração dos estiletes no tecido vegetal; 2) salivação (formação de bainha salivar, atividade de pré-alimentação); e 3) ingestão (sucção de fluídos) (Tjallingii, 1978; Walker, 2000). Além disso, é possível correlacionar as ondas com a posição dos estiletes nos tecidos vegetais (via estudos histológicos), o número de eventos alimentares (quantas vezes o inseto se alimentou) e o tempo gasto em cada um desses locais de alimentação.

Quanto à nomenclatura das ondas gravadas, ainda não há uma regra específica. Em pentatomídeos, foi criada uma nomenclatura própria, baseada no nome científico do percevejo estudado. Por exemplo, para o percevejo marrom, *Euschistus heros* (F.), as ondas são nomeadas por “Eh” seguido de um número para indicar o tipo da onda (ex.: Eh1, Eh2, Eh3, etc.) e de uma letra minúscula para indicar os subtipos, quando presentes (ex.: Eh1a, Eh1b, Eh1w, Eh3a, Eh3b, etc.), lembrando que cada uma dessas ondas corresponde a uma atividade ou a um sítio diferente (Lucini; Panizzi, 2018b).

Para cada onda que é gravada, os componentes elétricos precisam ser determinados. No caso de frequência e de amplitude relativa, os cálculos são fáceis, porém trabalhosos e demorados, pois devem ser feitos manualmente. Por outro lado, a origem elétrica (R ou emf) de uma onda é baseada na sua interpretação quando a mesma é gravada em diferentes níveis de impedância (R_i) pois, em baixos níveis de R_i (10^6 Ohms e 10^7 Ohms), o componente R é enfatizado, tornando-se primariamente R em 10^6 Ohms (modelo com afídeos). Em contrapartida, o componente emf é enfatizado em maiores níveis de R_i (10^9 Ohms a 10^{13} Ohms), tornando-se primariamente emf em 10^{13} Ohms (modelo com afídeos) (Backus; Bennett, 2009).

O componente R está relacionado com mudanças na condutividade elétrica na interface inseto-planta, e esse componente pode ser afetado por diferentes atividades biológicas, como a alteração da concentração de íons no canal salivar e alimentar. A concentração de íons no canal alimentar varia de acordo com o tipo de alimento ingerido. Em um alimento mais concentrado, a corrente elétrica flui sem grandes restrições (baixa resistência), logo o componente R é enfatizado. Por outro lado, o oposto ocorre em um alimento menos concentrado em íons. Em contrapartida, no canal salivar, a concentração de íons varia de acordo com o tipo de saliva secretada: saliva gelificante tem maior condutividade, enquanto que a saliva aquosa (diluída) é menos condutiva (Walker, 2000).

O componente emf está relacionado com biopotenciais na interface inseto-planta, ou seja, processos biológicos na planta, no inseto ou em ambos que geram pequenas correntes elétricas que são adicionadas ao sistema. Basicamente, há dois fenômenos biológicos responsáveis pelo emf: potencial de membrana e potencial de fluxo ou de transmissão. No primeiro caso, o potencial é desencadeado pela diferença de cargas (íons) que estão

presentes em cada lado da membrana celular; de maneira geral, na porção interna da membrana, as cargas são negativas, enquanto externamente são positivas (Figura 4A).

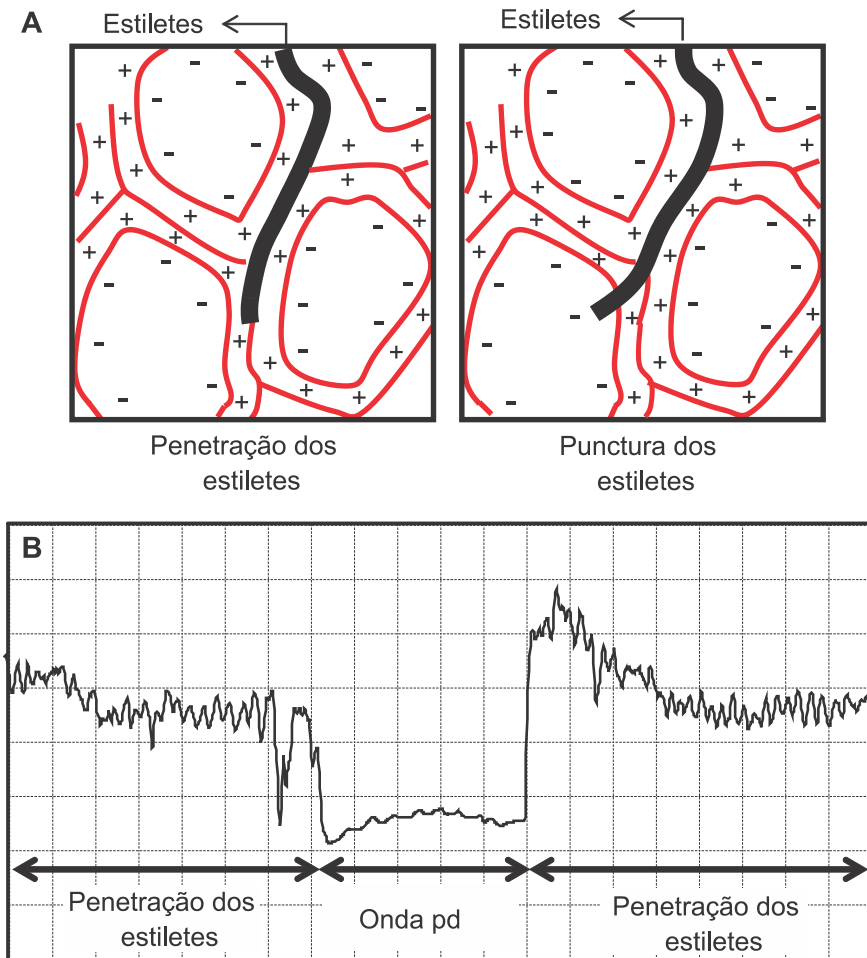


Figura 4. (A) Representação das porções externa e interna da membrana celular, mostrando a disposição das cargas positiva (externamente) e negativa (internamente). (B) Onda de queda de potencial (pd) gravada no momento em que os estiletos penetram a célula (punctura), ocasionando a queda de potencial devido à presença de cargas negativas internamente.

Fonte: (A) Adaptado de Walker (2000).

A existência desse potencial é nítida quando se gravam as atividades de pulgões que, durante a penetração dos estiletes, fazem pequenas puncturas celulares (teste de células), acarretando em quedas de potencial conhecidas como *potential drop* (onda pd) (Figura 4B) (Walker, 2000). No caso de insetos maiores, como percevejos, não há essa onda pd em função do diâmetro dos estiletes ser muito maior; nesse caso, a penetração dos estiletes rasga as células.

O segundo componente biológico que gera o emf é o potencial de fluxo ou de transmissão. Esse ocorre quando um fluido contendo íons se movimenta entre duas extremidades de um tubo, como nos canais alimentar (ingestão de alimento) e salivar (secreção de saliva) dos estiletes. Durante o movimento de fluidos nos estiletes, as cargas (íons) aderem-se na parede do canal, e essa separação de cargas faz com que o fluxo seja desigual ao longo do tubo, gerando o potencial de fluxo (Figura 5). Uma vez que o movimento de fluidos cessa, esse potencial desaparece (Walker, 2000). Quanto maior o diâmetro dos canais, maior será o movimento de fluidos e, por consequência, maior será o potencial gerado.

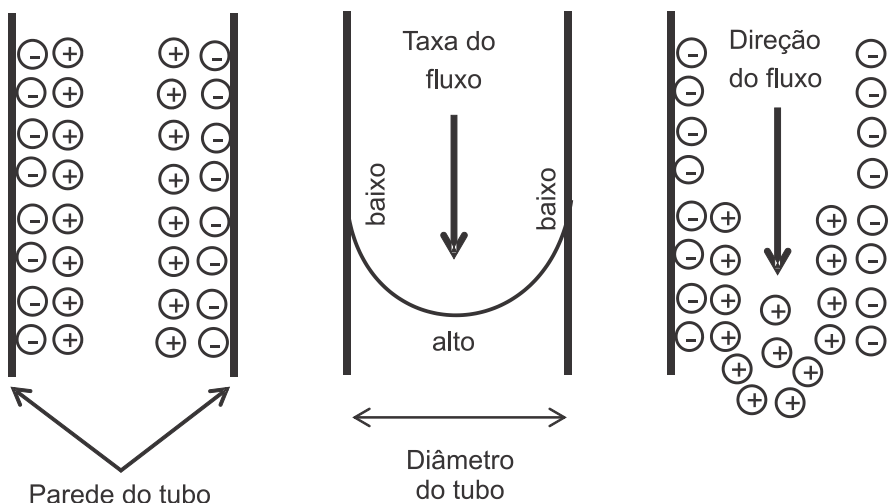


Figura 5. Representação esquemática da ocorrência do potencial de fluxo criado a partir do movimento de fluidos em um tubo (capilar), em que a adesão de cargas (íons) nas paredes do tubo gera uma separação de cargas e um fluxo desigual do fluido.

Fonte: Adaptado de Walker (2000).

O que se busca nas gravações de EPG é que o equipamento capture ambos os componentes elétricos em uma proporção de 50%:50%, pois ambos são aditivos, porém inversamente proporcionais. Logo, deve-se primeiramente estabelecer, através de estudos, qual a melhor impedância (R_i) de gravação que permita obter o máximo de ambos os componentes, pois, de acordo com o valor de R_i aplicado, um componente é mais enfatizado do que o outro. Como já mencionado anteriormente, em baixos níveis de R_i o componente R é enfatizado, tornando-se apenas R em 10^6 Ohms. Em contrapartida, o componente emf é enfatizado em maiores níveis de R_i ($> 10^9$ Ohms), tornando-se apenas emf em 10^{13} Ohms (Backus; Bennett, 2009) (Figura 6). No caso de percevejos, os estudos têm demonstrado que um R_i de 10^7 Ohms a 10^8 Ohms permite obter ambos os componentes elétricos, em proporções similares. Em pulgões, por exemplo, o melhor é 10^9 Ohms (Figura 6). Ou seja, os dados mostram que, quanto maior o tamanho corporal do inseto, menor deve ser o nível de impedância aplicado.

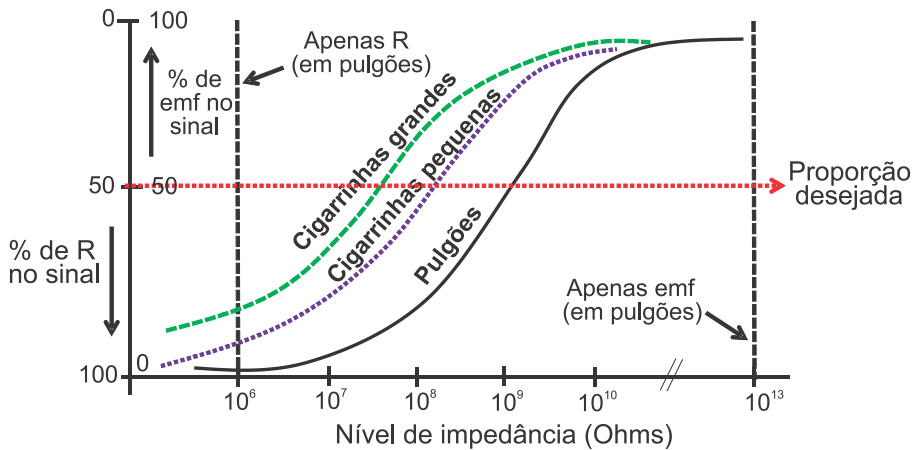


Figura 6. Representação da curva de resposta para alguns insetos sugadores, demonstrando a alteração dos componentes de resistência (R) e de força eletromotriz (emf) no sinal (onda) em diferentes níveis de impedância.

Fonte: Adaptado de Backus (2016). Courtesy E. A. Backus-© APS. Reproduced by permission, from Backus, E. A. 2014.

3. Aparelho bucal e estratégias de alimentação dos percevejos (Pentatomidae)

Os percevejos apresentam as peças bucais modificadas em estruturas sofisticadas semelhantes a pequenas agulhas, chamadas de estiletes (Figura 7A). Os estiletes são estruturas finas e flexíveis que são inseridas pelo inseto no tecido vegetal durante sua alimentação. Os percevejos apresentam quatro estiletes (dois mandibulares e dois maxilares) que ficam alojados em um tubo chamado de rostró.

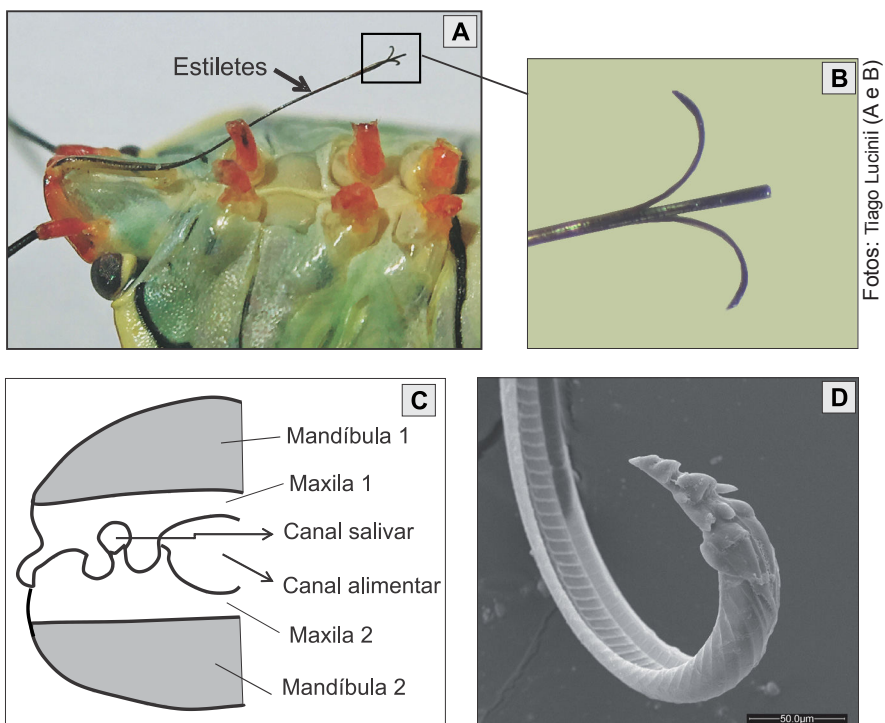


Figura 7. (A) Aparelho bucal de percevejos, composto por estiletes, sem rostró; (B) detalhe dos dois estiletes mandibulares dispostos externamente e dos dois maxilares unidos, formando uma única estrutura no centro; (C) esquema da disposição dos estiletes e da formação dos canais salivar e alimentar, a partir da união dos dois estiletes maxilares; (D) detalhe da ponta da mandíbula, mostrando a presença de pequenos dentes.

Fonte Figura 7D: Depieri; Panizzi (2010).

Ilustração Figura 7C: Tiago Lucini

Os dois estiletes maxilares estão dispostos no centro e unem-se através de um mecanismo de engate para formar dois canais, um salivar e um alimentar (Figuras 7B, 7C). Externamente, e envolvendo os estiletes maxilares, estão dispostos os dois estiletes mandibulares, os quais apresentam pequenos dentes na sua extremidade (Figura 7D) que servem para rasgar o tecido vegetal (Chapman, 1998). O canal alimentar serve para a ingestão (sucção) do alimento; já o canal salivar serve para a secreção de saliva, que pode ser de dois tipos: gelificante ou aquosa. A saliva gelificante é sólida e tem como função ancorar os estiletes durante a penetração; a saliva aquosa é líquida, dispersiva e rica em enzimas digestivas. Os dois tipos de saliva podem ser secretados simultaneamente e misturados (Hori, 2000).

De maneira geral, os insetos sugadores de plantas podem empregar dois tipos de estratégias de alimentação: 1) via bainha salivar; e 2) via ruptura celular. Na primeira estratégia, os estiletes ficam envoltos por uma bainha salivar formada a partir da secreção de saliva gelificante. Essa bainha é secretada durante todo o percurso de penetração dos estiletes nos tecidos da planta, até atingir as células dos vasos condutores da planta (xilema e floema), onde realizam a ingestão da seiva (Figura 8). As bainhas secretadas permanecem nos tecidos após a retirada dos estiletes (Backus et al., 2005) e, no caso de percevejos, têm servido como indicativo para estimar a frequência alimentar (Bowling, 1980).

Na estratégia via ruptura celular, o inseto secreta pouca ou nenhuma saliva gelificante. No caso de percevejos pentatomídeos, há a secreção desse tipo de saliva, para formar uma bainha salivar incompleta, apenas no início da inserção dos estiletes no tecido vegetal. Durante essa estratégia alimentar, o inseto faz uso de uma de duas táticas principais: dilaceramento ou maceramento. Durante a tática de dilaceramento, ocorrem movimentos rápidos, profundos e contínuos dos estiletes para dentro e para fora do tecido vegetal (Figura 9). Essa atividade causa a destruição mecânica das células, ocasionada pela ação dos estiletes mandibulares que rasgam o tecido. Na tática de maceramento, os estiletes movem-se lentamente para espalhar a saliva aquosa rica em enzimas digestivas para degradar as células. Mesmo movendo lentamente os estiletes, o dano químico ocasionado nos tecidos da planta é grande. Em ambas as táticas, o inseto ingere o “caldo” produzido pela degradação mecânica e/ou química (Backus et al., 2005). De maneira

geral, os insetos sugadores empregam as táticas de dilaceramento e de maceração separadamente; entretanto, os percevejos parecem usar uma mistura das duas táticas simultaneamente, o que seria uma evolução no processo alimentar (Lucini; Panizzi, 2018a).

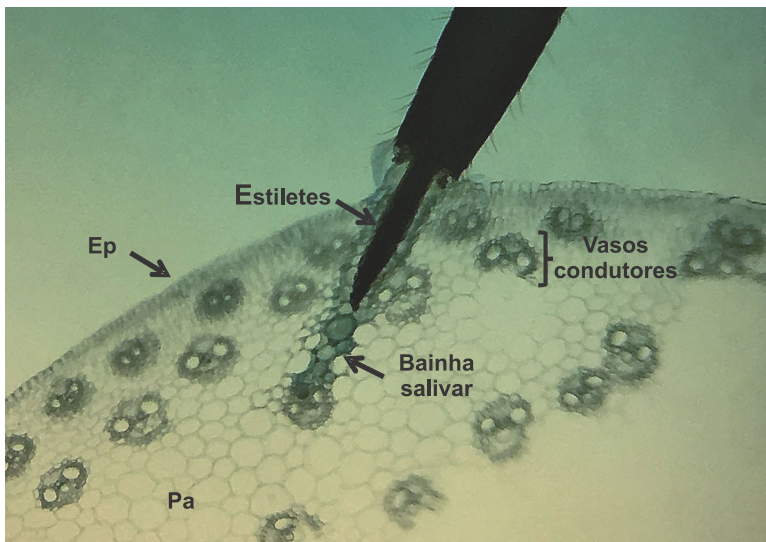


Figura 8. Corte histológico do colmo de plântula de milho contendo os estiletes seccionados do percevejo *Dichelops melacanthus* (Dallas). Detalhe da bainha salivar secretada em torno dos estiletes desde a inserção e durante todo o percurso de penetração até atingir as células dos vasos condutores da planta. Ep: epiderme da haste; Pa: parênquima.

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2018a).

A maioria dos insetos sugadores (pulgões, mosca-branca, cigarrinhas, psílídeos, etc.) emprega exclusivamente uma estratégia alimentar durante as atividades alimentares no seu hospedeiro. Por outro lado, os estudos com EPG têm demonstrado que os percevejos pentatomídeos podem empregar ambas as estratégias alimentares na mesma planta hospedeira, mudando de acordo com o local de alimentação. Por exemplo, o percevejo verde pequeno *Piezodorus guildinii* (Westwood) emprega a estratégia da bainha salivar ao ingerir seiva dos vasos do xilema em folha, haste e vagem de soja; por outro lado, ao se alimentar do endosperma da semente de soja, o percevejo muda sua estratégia e passa a empregar a ruptura celular (Lucini et al., 2016; Lucini; Panizzi, 2018a). Essa capacidade de mudar a estratégia de alimentação nunca havia sido publicada em estudos com EPG para qualquer

tipo de inseto sugador. Isso mostra o quão sofisticado é o processo alimentar dos percevejos e a razão pela qual causam danos severos.

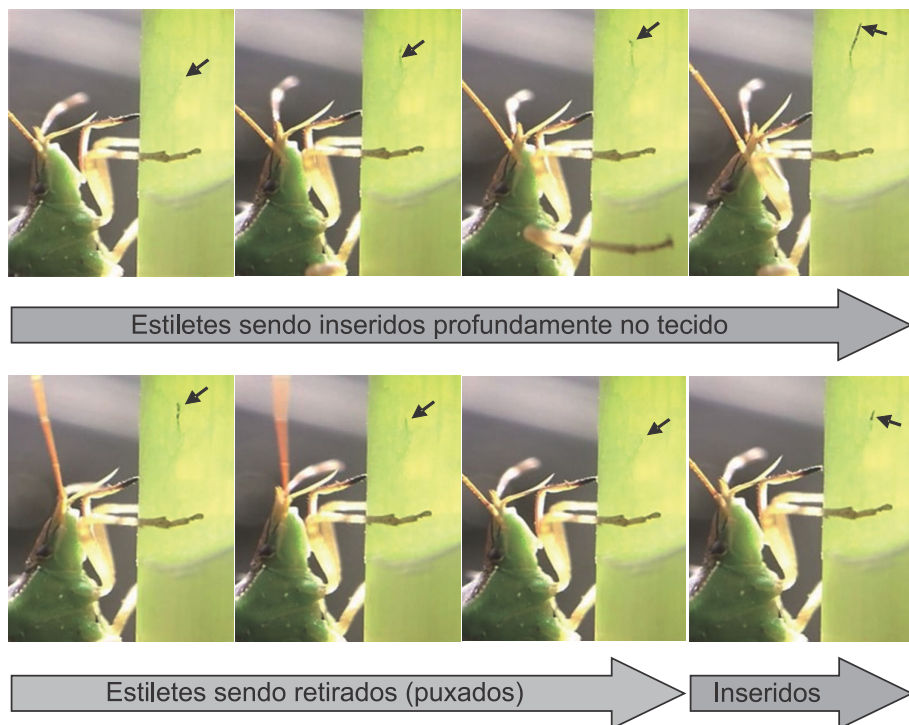


Figura 9. Sequência de movimentos dos estiletes de *Dichelops melacanthus* em colmo de plântula de milho, observada durante a tática de dilaceramento para destruir células (ação mecânica). As setas indicam as pontas de estilete no tecido vegetal.

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2018a).

4. Preparação (aramização) dos percevejos para uso no EPG

A fixação do fio de ouro no corpo do percevejo, processo conhecido por aramização, é uma atividade que afeta diretamente a qualidade das ondas. Uma aramização defeituosa causará efeitos negativos na visualização das ondas (presença de ruídos). Rotineiramente, utilizam-se fêmeas adultas nos experimentos para gravação das atividades alimentares. Deve-se ter cuidado

com a uniformização da idade dos insetos utilizados nos experimentos, principalmente em estudos quantitativos.

Ao se gravar a alimentação de uma espécie de percevejo pela primeira vez, é necessário criar uma biblioteca de formas de onda, que servirá de base para estudos futuros com aquela espécie. Para isso, deixam-se os percevejos em jejum por cerca de 15 horas, para estimular o inseto a se alimentar e, assim, possibilitar a gravação das ondas. No caso de experimentos quantitativos (comparação entre tratamentos), é necessário aclimatar os insetos nos alimentos a ser testados antes de iniciar as gravações, permitindo que eles se alimentem e se adaptem ao mesmo. Isso é importante, pois, de maneira geral, os percevejos são criados em uma dieta natural padrão, composta por vagem fresca de feijão, por sementes de soja e por amendoim.

Um dos grandes desafios encontrados, ao se iniciar a gravação das atividades de percevejos, é a dificuldade de manter o fio de ouro aderido ao corpo do inseto durante todo o tempo de gravação. Isso porque, comparados a insetos rotineiramente usados em EPG (pulgões, mosca-branca, cigarrinhas, etc.), os percevejos são insetos grandes, robustos e extremamente ativos (apresentando movimentos bruscos), o que dificulta a permanência do fio de ouro no seu corpo. Além disso, há lipídios depositados na cutícula do inseto que dificultam ainda mais a retenção do fio, pois o adesivo utilizado é à base de água. Para resolver esses problemas, algumas alternativas foram testadas e foi desenvolvida a técnica da raspagem, usando-se um pedaço de lixa odontológica para lixar a região dorsal (pronoto) do percevejo antes de depositar o adesivo para fixação (Figura 10). A raspagem do pronoto garante a aderência do fio de ouro ao corpo do inseto durante todo o tempo de gravação (Lucini; Panizzi, 2016).

Dois tipos de adesivos podem ser empregados em estudos com EPG: tinta de prata (produto comercial) e cola de prata (produzida artesanalmente). Este último tipo de adesivo é o mais empregado e é produzido a partir da mistura de 1 g de flocos de prata, 1 mL de cola branca e 1 mL de água. Em seguida, essa mistura é agitada em agitador por 10 minutos a 15 minutos, para homogeneizar. Recomenda-se fazer pequenas quantidades do adesivo, pois, com o tempo, o mesmo vai se tornando aquoso e, provavelmente, perdendo a condutividade elétrica.

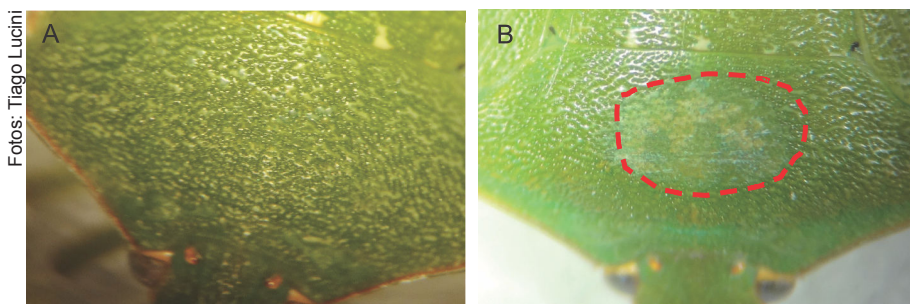


Figura 10. Pronoto do percevejo verde *Nezara viridula* (L.) antes (A) e depois (B) de lixado (área demarcada pela linha vermelha tracejada), usando-se lixa odontológica.

O eletrodo do inseto é composto de um filamento de fio de cobre (aproximadamente de 3 cm) soldado em um prego de latão (1,2 mm x 19,0 mm). Na extremidade do fio de cobre é enrolado e colado, com cola de prata, um filamento de fio de ouro (aproximadamente de 3 cm a 4 cm e com 0,1 mm de diâmetro) (Figura 11A). Um pequeno *looping* é feito na extremidade do fio de ouro com auxílio de uma pinça de ponta fina, servindo para aumentar a superfície de contato e a aderência no corpo do inseto (Figura 11B).

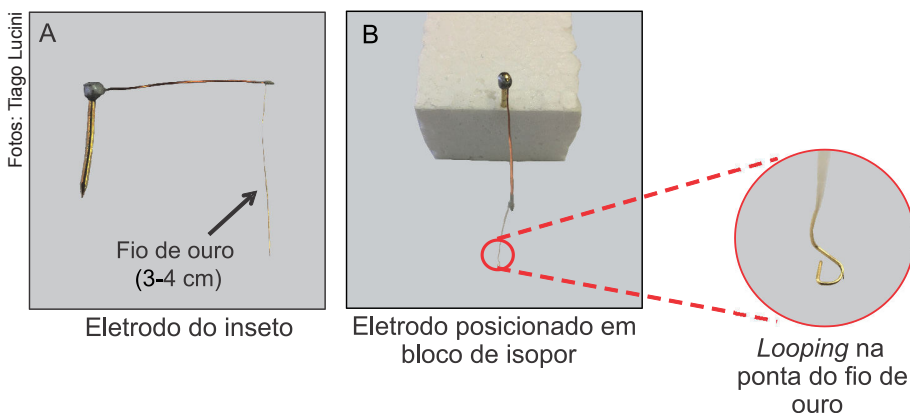


Figura 11. (A) Eletrodo do inseto, composto de um filamento de fio de cobre, soldado em um prego de latão, e um filamento de fio de ouro fixado no fio de cobre; (B) eletrodo posicionado em bloco de isopor para facilitar o manuseio e detalhe do *looping* feito na ponta do fio de ouro.

Os seguintes passos (Figura 12) devem ser seguidos para fixar o fio de ouro no corpo do percevejo:

- 1) imobilizar o percevejo em uma placa de Petri ou outro suporte, utilizando um pedaço de fita adesiva;
- 2) lixar o pronoto do percevejo com um pedaço de lixa odontológica e, em seguida, limpar a superfície lixada com um pincel;
- 3) posicionar o looping do fio de ouro na área lixada;
- 4) adicionar a cola de prata;
- 5) esperar a secagem da cola (15 minutos a 20 minutos) e remover a fita cuidadosamente com uma pinça.

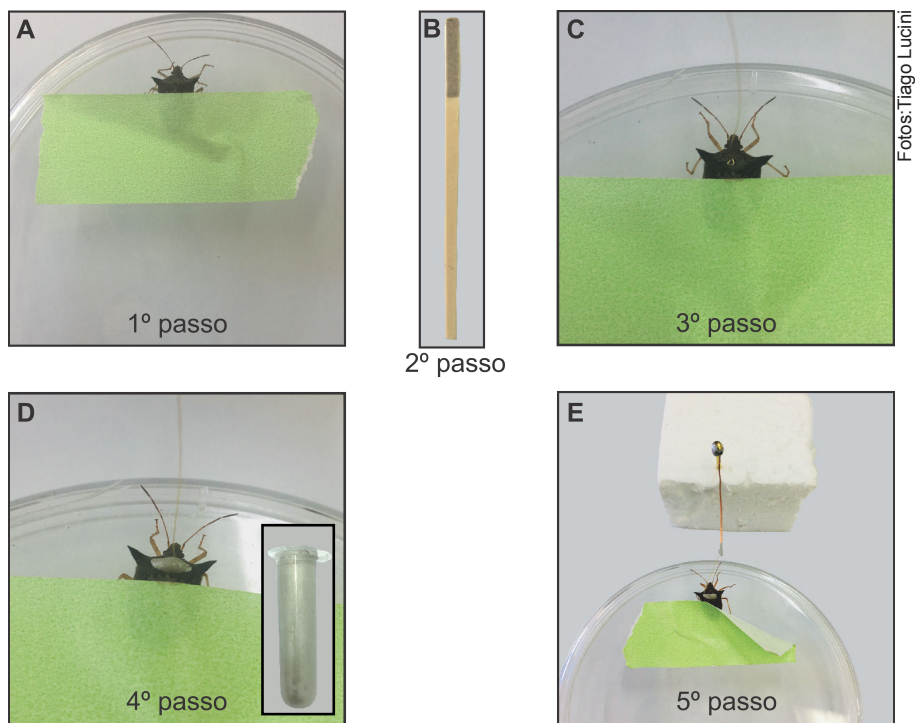


Figura 12. Passo a passo para a fixação do fio de ouro no corpo do percevejo. (A) Imobilização do percevejo com fita adesiva; (B) pedaço de lixa odontológica; (C) posicionamento do fio de ouro no pronoto do percevejo; (D) fixação do fio de ouro com cola de prata (no detalhe); (E) remoção da fita adesiva para liberar o percevejo.

Como já mencionado, a má qualidade da aramização afeta diretamente a qualidade das ondas ao longo da gravação do comportamento alimentar

do inseto. No exemplo abaixo, foi observado que, durante a gravação da alimentação do percevejo *Chinavia erythrocnemis* (Berg) em haste de soja, a cola de prata começou a se soltar do corpo do percevejo (Figura 13A, seta). Inicialmente, a onda de ingestão não apresentou ruídos (Figura 13B); contudo, conforme o inseto se movimentava, mesmo que suavemente, pequenas regiões com ruídos foram gravadas na onda (Figura 13C, setas) tornando-a praticamente irreconhecível e repleta de ruídos ao longo da gravação (Figura 13D).

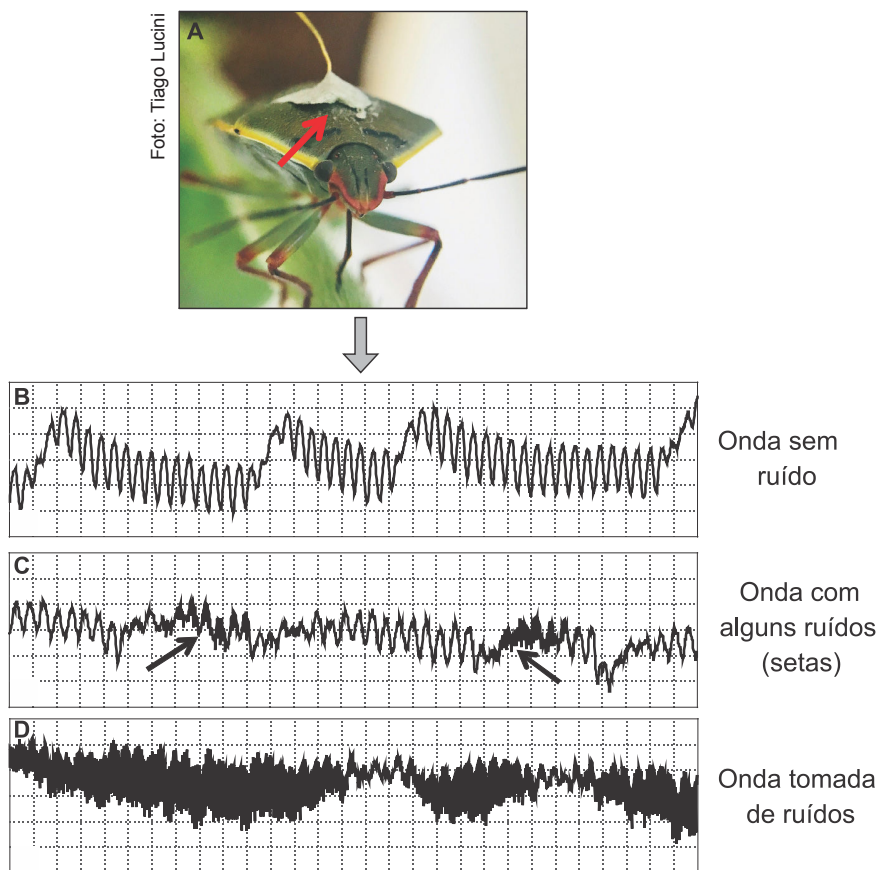


Figura 13. (A) Percevejo *Chinavia erythrocnemis* alimentando-se em haste de soja, mostrando o adesivo de prata soltando-se do corpo (seta); (B) onda de ingestão limpa e sem ruídos; (C) onda de ingestão contendo pequenas áreas com ruídos (setas); (D) onda de ingestão irreconhecível e dominada de ruídos.

5. Ajustes do software de gravação (Windaq)

Os passos que serão apresentados a seguir referem-se à calibração e ao ajuste do programa de gravação para o monitor AC-DC, que é mais indicado para percevejos. Para iniciar a gravação do comportamento alimentar e gerar as ondas, primeiramente deve-se instalar o software de aquisição (*Windaq Data Acquisition*) via CD-ROM enviado juntamente com o equipamento Windaq ou via site do fabricante (*Dataq Instruments*), download disponível em: www.dataq.com/products/di-710/di-710-uhd.html.

Após a instalação do programa, clicar no ícone *HardwareManager* e uma janela será aberta, mostrando o equipamento Windaq disponível para uso. Para abrir o programa, basta iniciá-lo (*Start Windaq*). Após a abertura, os seguintes passos devem ser seguidos:

- 1) Ir em “*Options*” e selecionar “*Scroll Mode*”. Assim, a gravação movimentar-se da esquerda para a direita.
- 2) Selecionar os canais a ser utilizados. Clicar em “*Edit*” e depois em “*Channels*”. Devem-se selecionar os canais a ser utilizados e dar “*OK*”. No monitor AC-DC, a identificação dos canais já é pré-definida como 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15, sendo que os canais 1, 5, 9 e 13 são gravados no sinal DC (chamado de sinal pré-retificação) e os canais 3, 7, 11 e 15, com o sinal AC (chamado de pós-retificação). Essa diferença se deve ao monitor AC-DC apresentar quatro canais que podem ser gravados tanto com corrente alternada (AC) quanto com corrente direta (DC); por isso devem-se marcar todos os oito canais (quatro AC + quatro DC).
- 3) Definir a taxa de gravação; nesse caso, deve-se adicionar o valor total considerando todos os canais utilizados. Para isso, clicar em “*Edit*” e, em seguida, em “*Sample Rate*”. Por convenção, aplicam-se 100 Hz por canal, e como gravamos com oito canais, devemos aplicar 800 Hz. Caso fossem gravados apenas três percevejos, seriam aplicados 600 Hz e assim por diante.
- 4) Visualizar as oito ondas simultaneamente na tela do computador. Clicar em “*View*” e, em seguida, em “*Format Screen*” e então selecionar “*8 Waveforms*,

overlapped”, sendo que as quatro ondas da esquerda da gravação são as ondas pré-retificação e as ondas da direita, as de pós-retificação.

5) Alterar a compressão da gravação. Clicar em “*Edit*” e, em seguida, em “*Compression*” e digitar “2” na janela que se abrirá.

6) Identificar os canais com o nome dos insetos a ser gravados. Clicar em “*Edit*” e, em seguida, em “*User Annotation*”. Por exemplo, *E. heros* em vagens de soja.

7) Posicionar, nesse momento, os percevejos aramizados nos amplificadores (EPG *probe*) desligados, e inserir o eletrodo da planta no solo.

7.1) Em seguida, checar se todos os amplificadores estão desligados e se os indicadores do nível de impedância (R_i) estão posicionados em 10^6 Ohms.

7.2) Ligar o *nobreak* (se disponível) e a fonte de energia do EPG.

7.3) Ligar os canais no box de controle.

7.4) Escolher a corrente elétrica, ajustar a voltagem do substrato e de ganho da onda (“*GAIN*”). Para percevejos, uma boa regulagem do EPG inclui: corrente alternada (AC), 50 mV de voltagem e ganho de onda variando de acordo com impedância e espécie de percevejo, mas geralmente entre 250 X e 350 X de ganho é suficiente.

7.5) Ligar os interruptores dos canais no box da interface (SIB).

7.6) Ligar o amplificador com ele estando em 10^6 Ohms.

7.7) Após ligado, fazer teste de toque, encostando o dedo no prego de latão e observando na tela do computador a ocorrência de picos. Se estes aparecerem, o equipamento está funcionando.

7.8) Escolher a impedância (R_i) desejada girando o indicador. Quando se gravam as ondas de um inseto pela primeira vez, é necessário criar uma biblioteca de formas de onda; para isso, é necessário gravar a alimentação dos insetos em diferentes níveis de R_i (normalmente usa-se de 10^6 Ohms a 10^9 Ohms). Um detalhe muito importante, após mudar o valor de R_i para níveis maiores: **NÃO** se deve tocar no eletrodo, ou no inseto, pois pode

danificar o canal. Se for necessário tocar no eletrodo/inseto, fazer uso de um pincel.

8) Iniciar a gravação e salvar o arquivo. Clicar em “*File*” e, em seguida, em “*Record*”.

9) Selecionar uma pasta de destino, nomear o arquivo e, em seguida, clicar em “*Abrir*” ou “*Open*”.

10) Determinar o tempo de gravação. Fica a critério do pesquisador e do objetivo do estudo. Em seguida, clicar em “*OK*”. As atividades do inseto serão registradas e salvas no computador. Durante a gravação, é possível inserir comentários que são muito úteis posteriormente para fazer correlações das atividades do inseto com as ondas ou mesmo para lembrar quando se faz qualquer alteração de configuração do equipamento durante a gravação (ex.: mudança de impedância, o tipo de corrente, aumento do ganho, etc.). Para isso, basta clicar em “*Edit*” e, em seguida, em “*Insert Commented Mark*” (atalho: teclas Shift + barra de espaço). Em seguida, escrever o comentário e clicar em “*OK*”. Quando o arquivo for aberto, as anotações estarão salvas e basta clicar em uma delas que o programa mostrará o momento no qual a anotação foi feita.

11) Para desligar o equipamento, após o término da gravação, basta seguir o processo inverso:

11.1) Voltar a impedância no amplificador para 10^6 Ohms e desligar.

11.2) Desligar os interruptores dos canais no box da interface (SIB).

11.3) Desligar os canais no box de controle.

11.4) Remover os insetos e as plantas.

Alguns cuidados devem ser tomados: gravar sempre na mesma hora do dia e nas mesmas condições (sala com luz contínua e temperatura controlada de, aproximadamente, 25 °C); determinar e padronizar o tempo mínimo de gravação de acordo com o objetivo do estudo; usar desenho experimental adequado, principalmente em experimentos quantitativos (blocos ao acaso, se possível, ou seja, todos os tratamentos ao mesmo tempo); e considerar um número adequado de insetos registrados por tratamento (recomendado de 15 a 20 insetos gravados com sucesso por tratamento).

6. Comportamentos alimentares de percevejos e suas respectivas ondas elétricas

Para qualquer inseto sugador, há basicamente duas fases durante a gravação do comportamento alimentar: 1ª) fase de não-alimentação; e 2) fase de alimentação. Cada fase tem suas respectivas atividades e é representada por uma forma de onda específica.

Na primeira fase, o comportamento do inseto é visualmente correlacionado com suas atividades. Até o momento, seis espécies de percevejos pentatomídeos tiveram seu comportamento caracterizado em diferentes plantas hospedeiras através da técnica de EPG (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de percevejos pentatomídeos estudados pela técnica de Gráfico de Penetração Elétrica (EPG), hospedeiros e as estruturas vegetais testadas.

Espécie ⁽¹⁾	Hospedeiro	Estrutura vegetal testada
<i>Edessa meditabunda</i> (F.)	Soja	Haste
<i>Piezodorus guildinii</i> (Westwood)	Soja	Folíolo, haste e vagem
<i>Dichelops melacanthus</i> (Dallas)	Milho	Colmo
<i>Dichelops furcatus</i> (F.)	Trigo	Colmo e espiga
<i>Euschistus heros</i> (F.)	Soja	Vagem
<i>Nezara viridula</i> (L.)	Soja	Haste e vagem

⁽¹⁾As espécies foram gravadas aplicando-se corrente alternada (AC) usando o monitor AC-DC, exceto para *E. meditabunda*, na qual foi aplicada corrente direta (DC) usando o monitor GIGA 8.

Nessas espécies de percevejos, três atividades de não-alimentação foram caracterizadas e correlacionadas com suas formas de onda: 1) inseto parado na superfície da planta; 2) inseto caminhando sobre a planta; e 3) inseto ovipositando. Uma quarta atividade (antenação), na qual o inseto toca a superfície da planta com a ponta das antenas, foi observada em mirídeos (Heteroptera) (Cervantes et al., 2016), porém tal atividade não foi observada em pentatomídeos.

Quando o inseto está parado na planta, a onda gravada é representada por uma linha sem variação (ou com pouca variação) na amplitude; por outro

lado, quando o percevejo se movimenta (caminha), a onda é representada por picos aleatórios, irregulares e de amplitude elevada (Figura 14). Ambas as ondas são facilmente reconhecíveis e separáveis uma da outra, e todos os percevejos gravados apresentam essas duas formas de onda.

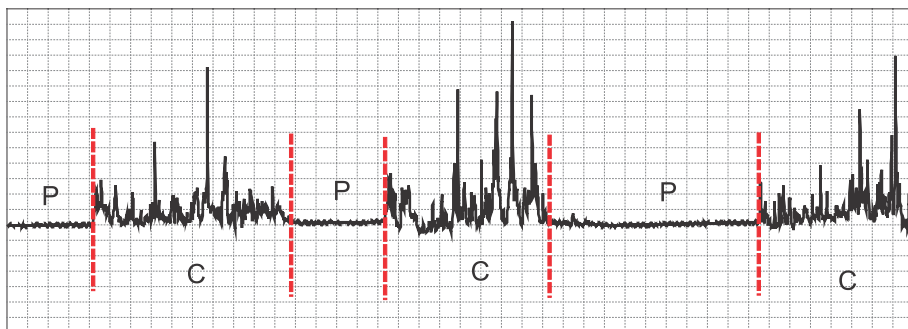


Figura 14. Formas de onda que representam o momento em que o percevejo está parado (P) ou caminhando (C) na superfície da planta.

Além das duas ondas citadas acima, uma outra onda relacionada a atividades não-alimentares foi gravada em percevejos. Essa onda também foi visualmente correlacionada com a deposição de ovos na superfície da planta. O exemplo abaixo representa a deposição de ovos de *Dichelops melacanthus* (Dallas) no colmo de plântulas de milho e sua respectiva forma de onda (Figura 15). O tempo necessário para a fêmea colocar um ovo foi de cerca de 25 segundos, e o intervalo de tempo entre uma postura e outra foi de, aproximadamente, 2 minutos (Lucini; Panizzi, 2017a).

Na segunda fase, o comportamento alimentar do inseto não pode ser visualmente correlacionado com suas respectivas atividades, pois todas as atividades ocorrem internamente nos tecidos vegetais. É nesse momento que a técnica de EPG se torna fundamental. Em percevejos pentatomídeos, duas atividades principais foram caracterizadas: 1ª) inserção e penetração dos estiletes e secreção da bainha, e 2ª) salivação e ingestão do alimento.

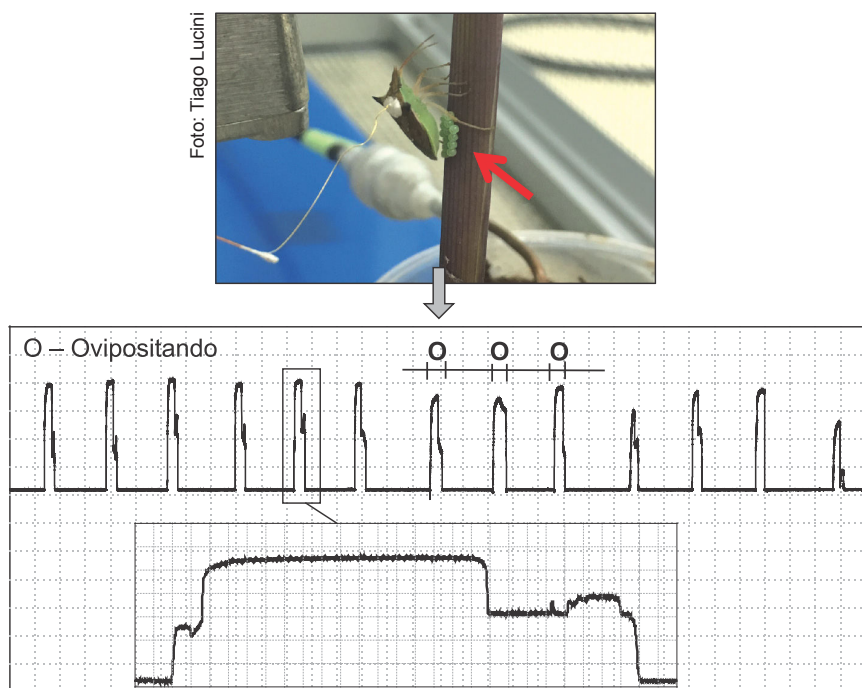


Figura 15. Forma de onda que representa a deposição de ovos de *Dichelops melacanthus* em colmo de plântulas de milho. Cada um dos picos, em destaque, corresponde à deposição de um ovo na superfície da planta (ovos indicados pela seta).

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2017a).

A primeira atividade que os percevejos fazem é a inserção e a penetração dos estiletes no tecido vegetal, em busca do seu sítio de alimentação. Durante essa atividade, há a secreção de saliva gelificante para criar a bainha salivar, que pode ser completa ou incompleta, dependendo da estratégia de alimentação empregada do sítio de alimentação utilizado. No momento em que o percevejo insere o estilete no tecido vegetal (indicado pela seta preta nas Figuras 16A e 16B), há uma variação repentina do potencial, que pode ser negativa (queda, indicada pela seta vermelha, Figura 16A) ou positiva (aumento, indicado pela seta vermelha, Figura 16B). Essa variação negativa ou positiva depende da situação e ambas podem ocorrer durante eventos de alimentação de um mesmo inseto. Sempre que há a inserção dos estiletes no tecido vegetal, a corrente elétrica flui facilmente pelos canais dos estiletes e pelo inseto, e isso ocasiona uma variação repentina do potencial (negativa ou positiva) que indica a penetração das células.



Figura 16. Forma de onda relacionada com inserção e penetração dos estiletos de percevejos pentatomídeos em plantas hospedeiras. Seta preta indica o momento em que o percevejo insere seus estiletos no tecido vegetal, ocasionando uma queda de potencial (A, seta vermelha) ou aumento de potencial (B, seta vermelha). A linha vermelha tracejada, na vertical, indica o fim da penetração dos estiletos e o momento em que o percevejo atinge um dos locais de alimentação.

Uma vez que o percevejo tenha inserido e penetrado os estiletos no tecido vegetal da planta hospedeira, ele atinge um dos sítios de alimentação. No caso de percevejos pentatomídeos já estudados com a técnica de EPG (Tabela 1), foram caracterizados quatro sítios de alimentação distintos:

- 1) vasos do xilema;
- 2) vasos do floema;
- 3) células do parênquima;
- 4) endosperma das sementes.

Todos os percevejos empregaram a estratégia de bainha salivar ao alimentarem-se nos vasos condutores do xilema e do floema. Por outro

lado, ao alimentarem-se das células do parênquima e do endosperma de sementes, os percevejos mudaram de estratégia e passaram a utilizar a ruptura celular, empregando ambas as táticas, dilaceramento e maceramento, simultaneamente.

6.1 Vasos do xilema

Todos os pentatomídeos estudados até o momento ingeriram seiva nos vasos do xilema durante suas atividades alimentares em estruturas vegetativas e reprodutivas de seus hospedeiros. A questão que fica é se os percevejos utilizam esse local como fonte de nutrientes ou apenas para hidratação e balanço hídrico, uma vez que o xilema é rico em água e sais minerais apenas (Taiz; Zeiger, 2004). No caso do percevejo asa-preta, *E. meditabunda*, do qual é reconhecida sua preferência por se alimentar em hastes de soja, ao invés de sementes (Silva et al., 2012), a ingestão nos vasos do xilema foi repetida frequentemente pelos percevejos (mais de três vezes por inseto durante o tempo de gravação) e por longos períodos de tempo (cerca de 60 minutos por evento de ingestão); isso indica que essa espécie de percevejo utiliza os vasos do xilema, mesmo que pobre em nutrientes, como fonte alimentar (Lucini; Panizzi, 2016).

As demais espécies de percevejos avaliados no EPG são reconhecidas por sua preferência de alimentarem-se de sementes (endosperma - tecido de reserva) em seus hospedeiros. Logo, a ingestão nos vasos do xilema provavelmente sirva apenas para hidratação corporal e balanço de nutrientes, uma vez que o inseto se alimenta de um tecido altamente concentrado e rico em nutrientes (Beltrati; Paoli, 2006). Essa observação foi comprovada quando foi determinada a frequência (número de eventos de ingestão) e o tempo de cada evento de ingestão no xilema para essas espécies de percevejos. Todas apresentaram baixo número de eventos de ingestão no xilema (em geral, menor que uma vez e meia por percevejo) e eventos de curta duração (em geral, menor que 40 minutos por evento) (Lucini; Panizzi, 2018a).

Os dados mostram que houve variações nos parâmetros quantitativos relacionados aos vasos do xilema nas diferentes espécies de percevejos. Entretanto, as formas de onda correlacionadas com a ingestão nos vasos do xilema para as espécies foram similares entre si em relação às características elétricas e de aparência (Figura 17). Basicamente, a onda relacionada ao

xilema é composta por porções altamente regulares intercaladas com picos, de certa forma, distribuídos regularmente. Em geral, o que diferencia a onda do xilema entre as espécies de percevejos é a orientação dos picos, os quais podem ser positivos (orientados para cima) ou negativos (orientados para baixo). Entretanto, isso nem sempre acontece, pois essa inversão pode ocorrer entre indivíduos da mesma espécie e até mesmo durante a gravação de um mesmo inseto, e a razão para essas variações é desconhecida.

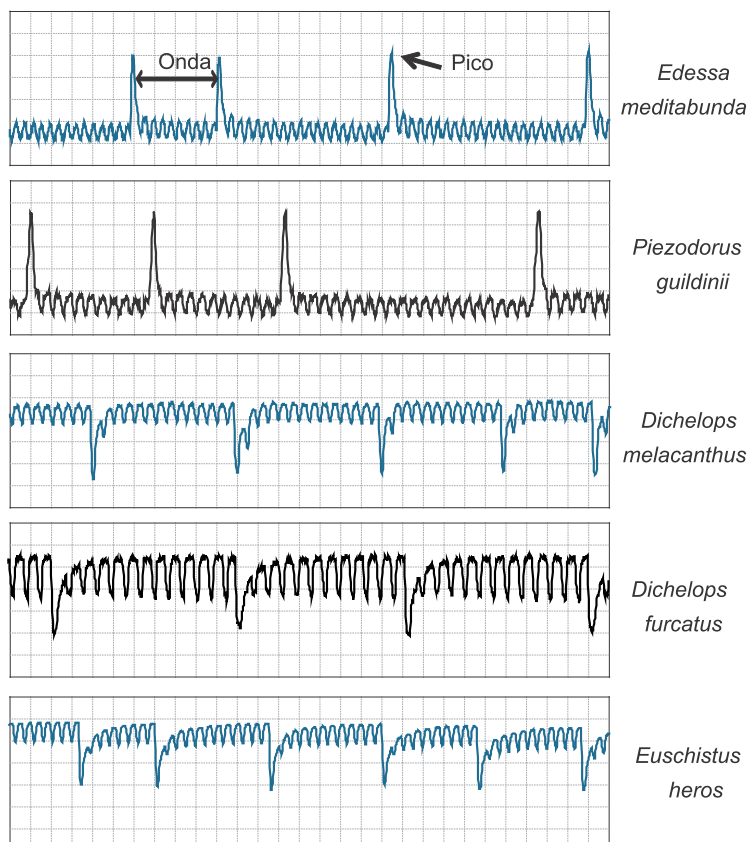


Figura 17. Formas de onda que representam a ingestão de seiva nos vasos do xilema registradas durante o comportamento alimentar de *Edessa meditabunda* em haste de soja, *Piezodorus guildinii* em folíolo, haste e vagem de soja, *Dichelops melacanthus* em hastes de plântulas de milho, *Dichelops furcatus* em haste e espigas de trigo e *Euschistus heros* em vagem de soja. Onda e pico são definidos no box de *E. meditabunda*.

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2018a).

6.2 Vasos do floema

Por enquanto, apenas *E. meditabunda* foi comprovado ingerindo seiva nos vasos do floema, ao alimentar-se de hastes de soja. Nesse caso, a onda relacionada à ingestão nos vasos do floema é completamente diferente da onda relacionada à ingestão no xilema. Ela é caracterizada pelo seu formato sinuoso, e essa sinuosidade apresenta um padrão de onda altamente repetitivo, regular e sem picos (Figura 18).

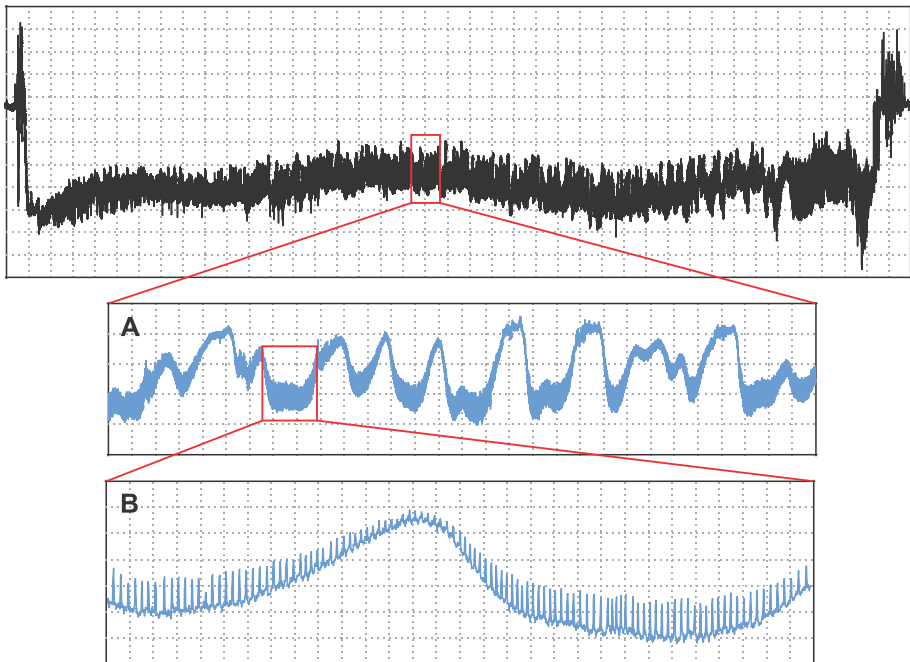


Figura 18. (A) Forma de onda representativa da ingestão de seiva do floema, registrada durante o comportamento alimentar de *Edessa meditabunda* em haste de soja, demonstrando a forma sinuosa (B), e uma visão ampliada da forma de onda mostrando seu padrão regular (C). Ondas gravadas aplicando-se corrente direta (DC).

De maneira geral, há uma forma de onda de transição que está intimamente relacionada à ingestão de seiva dos vasos do floema, chamada de forma de onda X (X-wave). Essas ondas de transição são do tipo espécie-específica e estão correlacionadas com a penetração dos estiletes e com as atividades

no sítio de alimentação preferido. Elas representam uma combinação de atividades, tais como salivacão, ingestão e egestão de fluidos, para testar o alimento e reconhecer o sítio alimentar (Backus et al., 2009). Ocorrem principalmente em insetos sugadores que se alimentam no floema (Wayadande; Nault, 1993; Backus et al., 2013), mas também já foi reportado em insetos que se alimentam exclusivamente no xilema, como algumas espécies de cigarrinhas (Backus et al., 2009).

Sempre que o percevejo *E. meditabunda* se alimentou nos vasos do floema em hastes de soja, foi observada uma forma de onda de transição e de curta duração, a qual foi considerada uma onda X, e que sempre ocorreu antes do percevejo iniciar a ingestão prolongada de seiva do floema. A onda X é caracterizada por um aumento gradativo da voltagem a partir do momento em que há a penetração dos estiletes no floema; além disso, a porção das ondas é orientada para baixo (Figura 19A). No final da onda X e no início da ingestão nos vasos do floema, observou-se breve e abrupta queda de voltagem na transição entre essas atividades (Figura 19B).

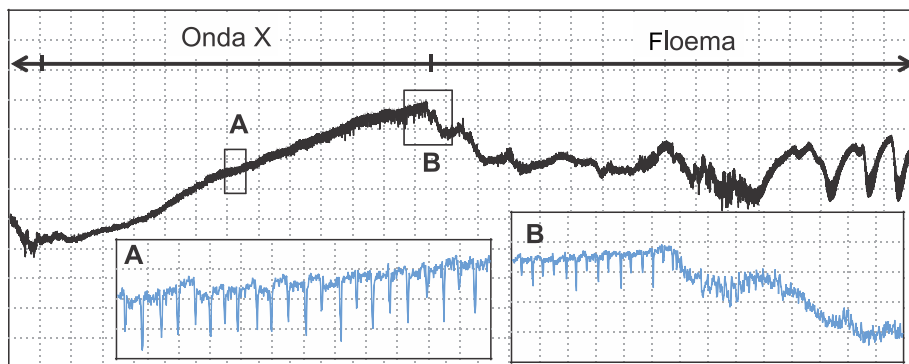


Figura 19. Formas de onda X (X-wave) e ingestão nos vasos do floema do percevejo *Edessa meditabunda* em hastes de soja. (A) Detalhe da forma de onda X mostrando um aumento gradual na voltagem e ondas voltadas para baixo; (B) período de transição entre a onda X e a onda de ingestão no floema.

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2016).

6.3 Células do parênquima

Apenas as espécies *D. furcatus* e *D. melacanthus* foram observadas nesse local de alimentação em colmos de plântulas de trigo e de milho, respectivamente. Nesse caso, ambos os percevejos empregaram a estratégia de ruptura celular durante suas atividades alimentares. Como visto anteriormente, durante essa estratégia, o percevejo faz uso das duas táticas de alimentação, dilaceramento e maceramento; logo, os estiletes movem-se em diferentes direções do tecido para romper mecanicamente e quimicamente as células vegetais. Portanto, além das células do parênquima, provavelmente as células dos vasos condutores (xilema e floema) também sejam destruídas.

Mesmo que as duas espécies de percevejos tenham se alimentado de hospedeiros diferentes, as ondas relacionadas a essas atividades foram similares entre as espécies. Essas atividades são representadas por uma forma de onda composta por dois subtipos diferentes que ocorrem intercalados entre si (Figura 20A). O primeiro subtipo é formado por picos contínuos e geralmente irregulares e orientados para baixo (Figura 20B); esse subtipo representa as táticas de dilaceramento e de maceramento das células vegetais, pois visualmente foi possível correlacionar essa onda com os movimentos rápidos e contínuos dos estiletes no tecido vegetal (ou seja, dilaceramento).

Por outro lado, o subtipo 2 é caracterizado por uma forma de onda com aparência regular e de curta duração, em comparação com o primeiro subtipo (Figura 20C). Portanto, essa onda provavelmente representa a ingestão do conteúdo celular degradado anteriormente. Tal observação é baseada no fato que, durante esse subtipo, os estiletes praticamente ficaram imóveis no tecido vegetal por um breve período de tempo, além de que esse subtipo se parece muito com outras formas de onda relacionadas com ingestão em outros sítios. Logo após ingerir o alimento, o percevejo retoma suas atividades de dilaceramento e de maceramento para, posteriormente, ingerir novamente, ou seja, o percevejo vai alternando essas atividades.

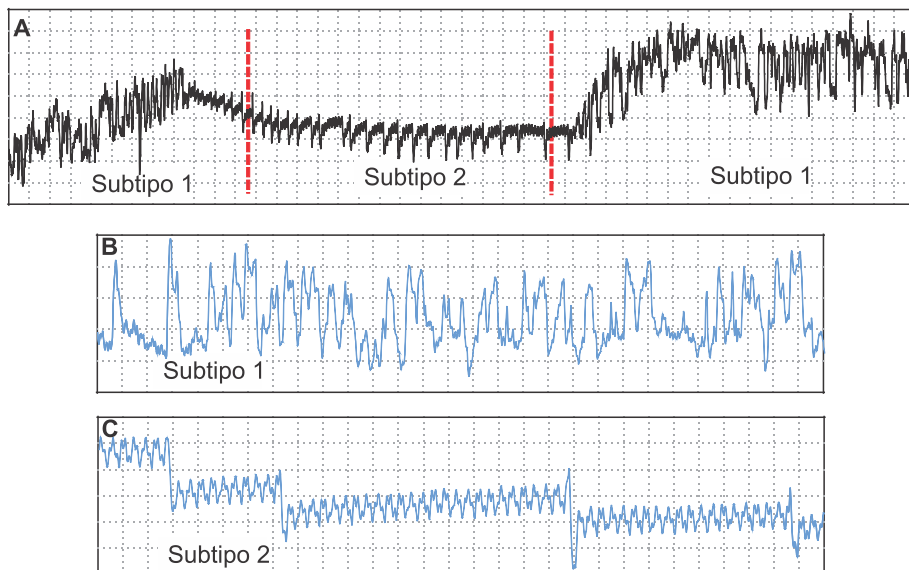


Figura 20. Detalhe das formas de onda que representam a estratégia de ruptura celular de *Dichelops furcatus* em colmo de plântulas de trigo. (A) Visão geral dos dois subtipos de ondas que ocorrem intercalados entre si; (B) detalhe do subtipo 1 (dilaceramento e maceração celular); e (C) detalhe do subtipo 2 (ingestão do conteúdo celular).

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2018a).

Ao empregar a estratégia de ruptura celular, o percevejo causa danos significativos e visuais nas plantas atacadas. Esses danos são decorrentes das atividades de dilaceramento e de maceração, as quais causam danos mecânicos e químicos no tecido vegetal, respectivamente. Na Figura 21 são mostrados os danos ocasionados por *D. melacanthus* adulto após alimentar-se durante 8 horas em uma plântula de milho (estádio V2 – duas folhas completamente desenvolvidas) em condições de laboratório. Inicialmente (após 24 horas da alimentação), são observadas pequenas pontuações esbranquiçadas nas folhas, que vão progredindo para dano mais acentuado no tecido vegetal, com morte e necrose das regiões atacadas (após 48 horas e 72 horas).

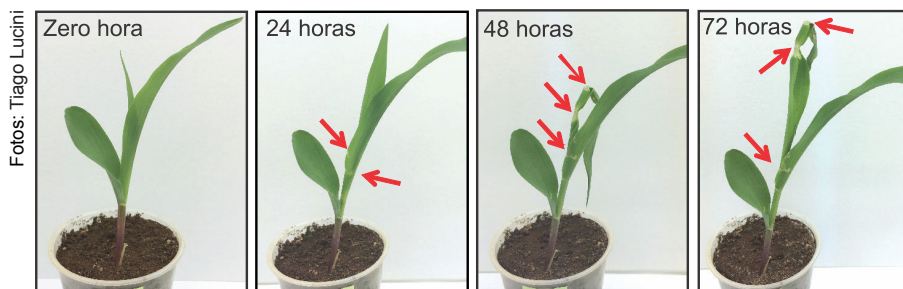


Figura 21. Progressão dos danos (setas) de *Dichelops melacanthus* após se alimentar durante 8 horas, em plântula de milho.

Em ataques mais severos, como acontecem em campo, podem ocorrer danos mais intensos, chegando a causar o chamado “coração morto”, no qual ocorre a morte da folha central em virtude do ataque estrangulando o ponto que foi atingido e impedir o fluxo de nutrientes para a parte acima do local do dano (Figura 22A). Além disso, o ataque pode induzir o perfilhamento da planta e, com isso, impedir seu desenvolvimento normal (Figura 22B).

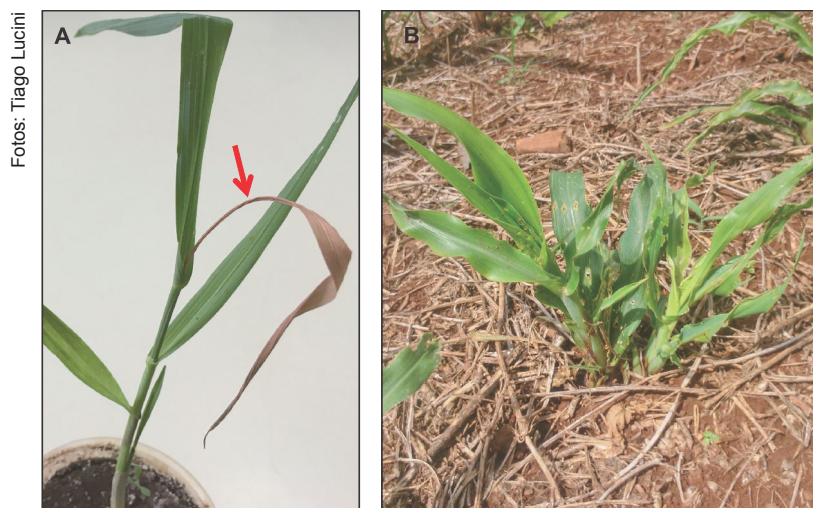


Figura 22. (A) Morte da folha central de trigo, sintoma conhecido como “coração morto” (seta), ocasionada pelas atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em plântula de trigo; (B) perfilhamento de plantas de milho, ocasionado pelo ataque de percevejos.

6.4 Endosperma das sementes

Todas as espécies de percevejos pentatomídeos estudados em estruturas reprodutivas alimentaram-se no endosperma das sementes de seus hospedeiros (Tabela 1). A grande maioria dos percevejos alimenta-se de sementes imaturas, que são seus locais favoritos (Panizzi; Silva, 2012).

Da mesma forma como no tecido do parênquima, os percevejos, ao alimentarem-se das sementes (endosperma), empregaram a estratégia de ruptura celular durante suas atividades alimentares. As quatro espécies avaliadas em estruturas reprodutivas apresentaram ondas que foram similares entre si. As atividades na semente foram caracterizadas por uma onda contendo dois subtipos distintos (Figura 23A). O primeiro subtipo foi formado por picos irregulares, positivos ou negativos, e distribuídos aleatoriamente ao longo da gravação (Figura 23B); entretanto, há casos raros em que a onda se tornou mais regular durante a gravação. Esse subtipo representa o emprego de táticas de dilaceramento e de maceramento das células vegetais, uma vez que, visualmente, são observados movimentos rápidos e contínuos dos estiletes no tecido vegetal durante esse subtipo.

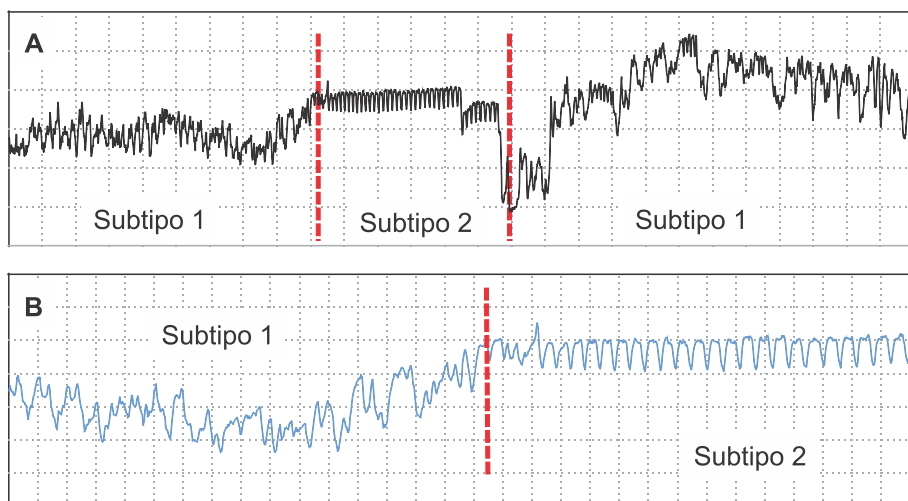


Figura 23. Formas de onda representando a estratégia de ruptura celular de *Euschistus heros* em vagens de soja. (A) Visão geral dos dois subtipos de ondas que ocorrem intercalados entre si, e (B) detalhes do subtipo 1 (dilaceramento e maceramento celular) e do subtipo 2 (ingestão do conteúdo celular).

O subtipo 2 foi caracterizado por sua aparência altamente regular e de curta duração, comparada com o primeiro subtipo (Figura 23B). Esse subtipo, provavelmente, representa a ingestão do conteúdo celular degradado anteriormente. Essa afirmação dá-se pela sua semelhança com outras formas de onda relacionadas com ingestão, além do fato de que os estiletes permaneceram praticamente imóveis por um breve período de tempo durante esse subtipo. Logo após o curto período de ingestão, o percevejo retomou suas atividades de dilaceramento e maceramento para, posteriormente, ingerir novamente, ou seja, o percevejo alterna essas atividades.

O emprego da estratégia de ruptura celular nas sementes e em qualquer estrutura vegetal promove a destruição dos tecidos por meio mecânico (estresse físico) e, principalmente, por meios bioquímicos (estresse químico), causados pela ação de enzimas digestivas secretadas na saliva aquosa. Esses danos são extensos e podem ser observados a olho nu ao se cortar as sementes atacadas (Figura 24).

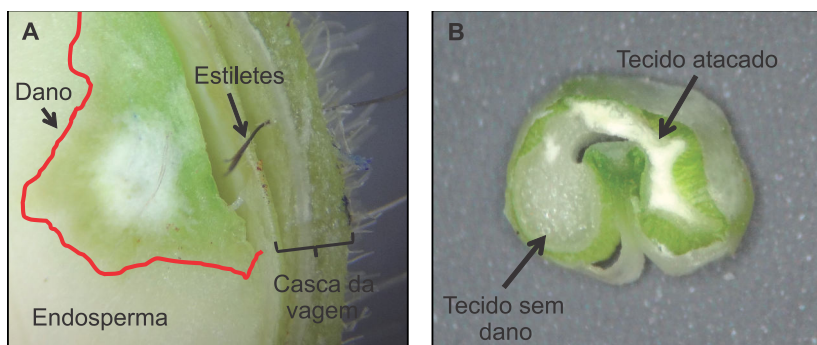


Figura 24. Danos ocasionados pelos percevejos *Piezodorus guildinii* (A) em semente de soja e *Dichelops furcatus* (B) em semente de trigo.

Fonte: Figura 24A: Adaptado de Lucini et al. (2016); Figura 24B: Adaptado de Lucini; Panizzi (2017b).

6.5 Retirada dos estiletes do tecido vegetal após as atividades alimentares

Após o término da atividade alimentar, o percevejo retira os estiletes do tecido vegetal e retorna às atividades de não-alimentação (parado ou caminhando). Essa retirada dos estiletes é uma atividade que pode ser muito rápida (duração de poucos segundos) ou levar alguns minutos (Figura 25). No caso de cigarrinhas, é reportado que ocorre a secreção de saliva gelificante para

preenchimento da bainha à medida que os estiletes são retirados (Backus et al., 2009); no entanto, para percevejos, isso ainda não foi provado.

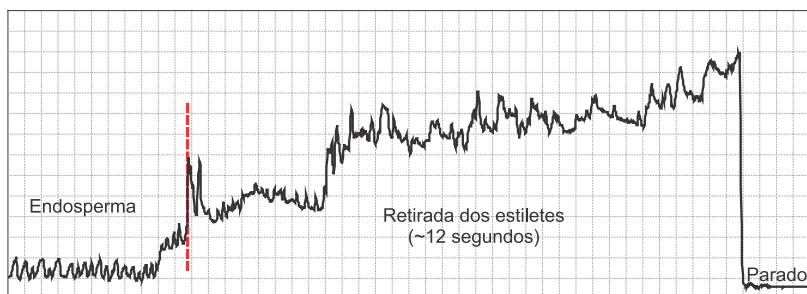


Figura 25. Parte final da alimentação do percevejo *Euschistus heros* no endosperma de semente de soja e as ondas que representam a retirada dos estiletes do tecido vegetal e, logo em seguida, o retorno às atividades de não-alimentação (parado).

Fonte: Adaptado de Lucini; Panizzi (2018b).

Frequentemente, após a retirada dos estiletes, é possível observar-se uma bainha salivar (saliva gelificante) depositada externamente na planta, a qual é chamada de flange (Figura 26A e 26B). Essas flanges podem servir como um indicativo para estimar a frequência alimentar.

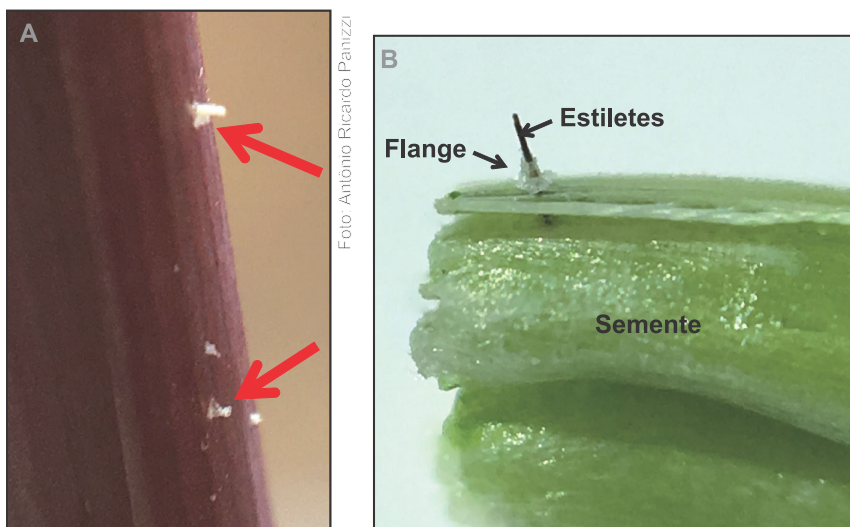


Figura 26. Flanges (A) de *Dichelops melacanthus* e (B) de *Dichelops furcatus* secretadas externamente em colmo de plântula de milho e em espiga de trigo, respectivamente.

Fonte Figura 26B: Adaptado de Lucini; Panizzi (2017b).

7. Correlação das ondas com seus locais de alimentação

Alguns métodos são empregados para se correlacionar as formas de onda com o local de penetração e com as atividades dos estiletes nos tecidos vegetais. Dentre esses, os que mais se destacam são: secreção de seiva, análise química de excretas, uso de dieta artificial e histologia de tecidos.

7.1 Secreção de seiva

A secreção de seiva é um método indireto para indicar que uma onda em questão representa a ingestão de seiva apenas dos vasos do floema. Isso acontece pelo fato desse tecido ser controlado por uma forte pressão positiva (Taiz; Zeiger, 2004) e, quando os estiletes penetram nessas células, essa pressão expulsa o conteúdo celular para fora. Logo, quando se seccionam os estiletes de um inseto alimentando-se no floema, há a exsudação contínua de seiva para fora, formando pequenas gotas (Figura 27). No xilema isso não acontece, pois esse tecido é controlado por uma forte pressão negativa (Taiz; Zeiger, 2004), o que impede a exsudação de seiva para o exterior, quando o vaso é penetrado pelos estiletes.



Figura 27. Exsudação de seiva (gota circundada pela linha vermelha tracejada) após o corte dos estiletes de *Edessa meditabunda* em haste de soja, indicando que os estiletes estavam posicionados nos vasos do floema.

Fonte: Lucini; Panizzi (2016).

7.2 Análise química de excretas

Essa forma de correlação é mais empregada em cigarrinhas. Nesse caso, uma forma de onda e o seu respectivo sítio de alimentação (xilema ou floema) podem ser correlacionados por meio de duas formas: 1) via determinação do pH das excretas; ou 2) via reação das excretas com substâncias indicadoras. No primeiro caso, é possível fazer a correlação pelo fato de que a seiva oriunda do xilema tem um valor de pH mais ácido (pH 5,4 a 6,5), enquanto que a seiva oriunda do floema é mais básica (pH 7,2 a 8,5). No segundo caso, as excretas são depositadas em papel filtro tratado com substância indicadora (por exemplo, ninidrina e azul de bromofenol). Ao reagir com a substância, se houver mudança de coloração (violeta, quando usado ninidrina, e azul para azul de bromofenol), significa que o alimento ingerido era oriundo dos vasos do floema; caso a reação seja negativa (sem coloração), o alimento teve origem nos vasos do xilema.

7.3 Uso de dieta artificial

Geralmente essa técnica está acoplada com vídeo-correlação. Nesse método, é inserido um eletrodo na dieta artificial e outro no inseto (fio de ouro descrito anteriormente), fechando o circuito elétrico. A dieta é posicionada sob uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio estereoscópio. Com isso, é possível observar diretamente os movimentos dos estiletes e as atividades de salivação e de ingestão de fluído e correlacioná-los com suas respectivas formas de onda gravadas simultaneamente no EPG. Entretanto, esse método apresenta alguns problemas, tais como: dificuldade de encontrar uma dieta que os insetos aceitem e o fato de que a dieta artificial não imita a planta hospedeira, apenas simula o tecido de ingestão (xilema ou floema).

7.4 Histologia de tecidos

Esse método permite traçar o caminho percorrido pelos estiletes nos tecidos da planta e determinar os locais onde estão inseridos (posição). Essa determinação do local pode ser baseada na posição terminal da bainha salivar (Figura 28A) ou baseada na posição terminal da ponta dos estiletes (Figura 28B).

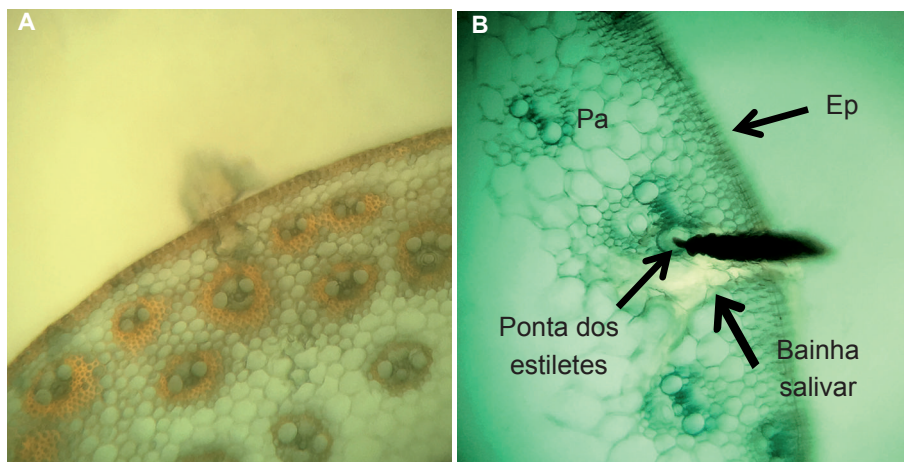


Figura 28. (A) Bainha salivar do percevejo *Dichelops melacanthus* terminando no tecido do parênquima durante sua respectiva forma de onda. (B) Ponta dos estiletos do percevejo *Dichelops furcatus* terminando nas células do xilema durante sua respectiva forma de onda. Ep: epiderme, Pa: parênquima.

Fonte Figura 28A: Adaptado de Lucini; Panizzi (2017a); Figura 28B: Adaptado de Lucini; Panizzi (2018a).

Uma vez que todas as ondas do inseto em estudo já foram caracterizadas, iniciam-se as gravações novamente com outros indivíduos. Quando uma onda, a qual se tem interesse de saber a posição da bainha salivar e/ou dos estiletos, é observada na tela do computador, as atividades alimentares do inseto são interrompidas artificialmente com o uso de um pincel. Caso seja feito o corte dos estiletos durante a onda, o equipamento deve ser primeiro desligado. Em seguida, o tecido vegetal é utilizado para o preparo de lâminas histológicas. Em geral, para o preparo das lâminas faz-se uso de um micrótomo, equipamento que serve para fazer cortes extremamente finos e precisos, porém envolve um processo complexo que exige protocolos específicos e demorados. Por outro lado, há a possibilidade de fazerem-se cortes manuais do tecido vegetal, utilizando uma lâmina afiada (lâmina de barbear, bisturi, etc.), ou seja, um método bem mais simples e rápido, apropriado para o caso dos percevejos.

O primeiro passo é cortar os estiletos do percevejo com uma tesoura entomológica e identificar a onda à qual esse corte corresponde. Em seguida, sob um microscópio estereoscópio, fazem-se cortes finos no tecido vegetal

utilizando-se uma lâmina afiada, até produzir um corte o mais fino possível contendo o estilete inserido (Figura 29).

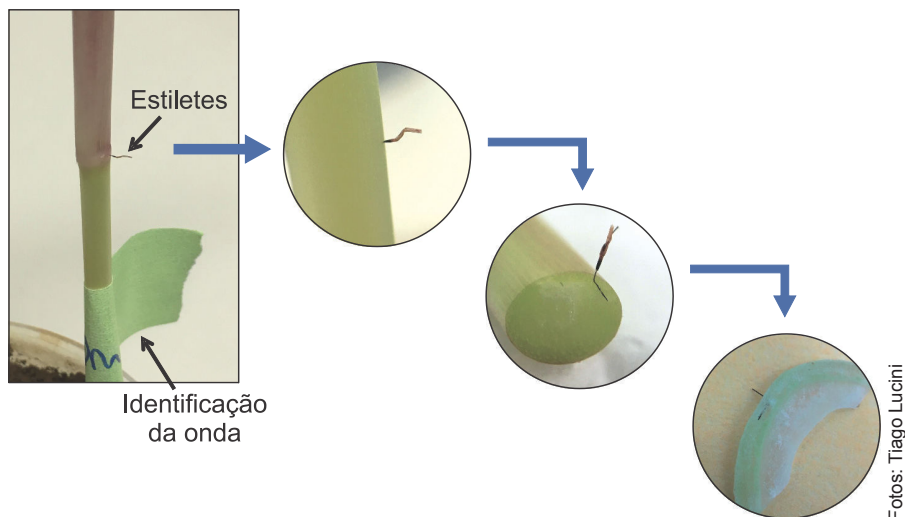


Figura 29. Esquema do processo para obtenção dos cortes do tecido vegetal contendo os estiletes do percevejo *Dichelops melacanthus* inseridos em colmo de milho.

Em seguida, os cortes são submetidos a um protocolo simples para o preparo e a obtenção das lâminas histológicas (Figura 30). Primeiro, o corte é mergulhado em uma solução de hipoclorito de sódio (10%) por cerca de 5 minutos para clarificar o tecido vegetal; em seguida, é enxaguado em água destilada por 2 minutos a 3 minutos. Na sequência, é feita a coloração do tecido vegetal utilizando-se o corante azul de toluideno (1%) por, aproximadamente, 5 minutos, e depois enxaguado em água destilada por mais 2 minutos a 3 minutos. Por fim, o corte é posicionado na lâmina, adicionando-se uma gota de fixador e a lamínula, para lacerar. Essa lâmina é, então, identificada com a sua respectiva onda e, cerca de 24 horas após a preparação, as laterais da lamínula são seladas com esmalte incolor, para evitar o vazamento do fixador ou o deslocamento da lamínula.

Posteriormente, essas lâminas são observadas em microscópio para determinar a posição dos estiletes/bainha no tecido vegetal, bem como para se obterem imagens para cada forma de onda de interesse.

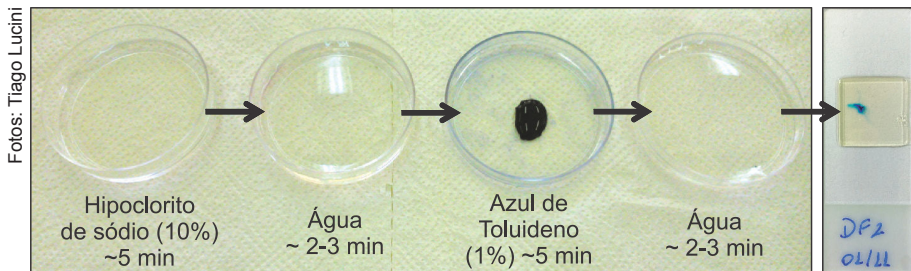


Figura 30. Etapas para obtenção das lâminas histológicas com cortes dos tecidos vegetais contendo os estiletes do percevejo.

Esse método tem algumas vantagens, como ser rápido e não requerer protocolos complexos, e a obtenção das lâminas é feita em curto período de tempo. Porém, tem como desvantagem o fato de não poder ser realizado com qualquer tipo de estrutura vegetal (por exemplo, folhas, plântulas de cereais em estágio inicial de desenvolvimento, etc.) e requerer habilidade e cuidado na hora de cortar os estiletes do percevejo e os tecidos da planta.

8. Considerações finais

A tecnologia do monitoramento eletrônico de insetos sugadores por meio do uso do EPG, que teve início nos anos 60 com insetos sugadores pequenos (afídeos, em especial), atualmente constitui-se na principal ferramenta para monitorar as atividades alimentares dos percevejos.

A *expertise* no uso do EPG em percevejos foi desenvolvida pioneiramente na Embrapa Trigo, com o monitoramento de atividades de cinco diferentes espécies de percevejos, pragas de grandes culturas (*commodities*) como a soja, o milho e o trigo. Além de haverem sido construídas bibliotecas de ondas elétricas, referentes às diferentes atividades, essas ondas foram correlacionadas, através de estudos histológicos, com os diferentes sítios de alimentação. Esses resultados abrem perspectivas as mais variadas, que podem ser utilizadas em possíveis estratégias de controle usando inseticidas sistêmicos ou outras toxinas eventualmente inseridas nas plantas, por mecanismos genéticos pelo melhoramento tradicional ou por métodos inovadores usando a biotecnologia. Em adição, o monitoramento eletrônico pelo uso do EPG permite caracterizar o impacto de cultivares que

apresentam tolerância à ação dos percevejos, muitas vezes despercebidas. Tempo e frequência de alimentação, por exemplo, são parâmetros básicos que facilmente podem ser desvendados com o uso do EPG.

Em conclusão, o EPG constitui-se hoje no principal fator a ser explorado como uma ferramenta para desvendar o processo alimentar sofisticado dos percevejos, com vistas a mitigar o efeito dos danos das espécies-pragas das grandes culturas no país. Esforços estão sendo dedicados para se estabelecer uma rede nacional de pesquisa no assunto, visando a somar esforços, a evitar duplicação e a fazer do país uma referência internacional nesses estudos avançados.

9. Referências

- BACKUS, E. A. Sharpshooter feeding behavior in relation to transmission of *Xylella fastidiosa*: a model for foregut-borne transmission mechanisms. In: BROWN, J. K. (Ed.). **Vector-mediated transmission of plant pathogens**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2016. p. 175-193.
- BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC–DC Correlation Monitor: New EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 10, p. 869-884, 2009.
- BACKUS, E. A.; HOLMES, W. J.; SCHREIBER, F.; REARDON, B. J.; WALKER, G. P. Sharpshooter X wave: Correlation of an electrical penetration graph waveform with xylem penetration supports a hypothesized mechanism for *Xylella fastidiosa* inoculation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 5, p. 847-867, 2009.
- BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, n. 4, p. 524-539, 2013.
- BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005.
- BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. Semente. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: MG, Ed. UFV, 2006. p. 399-438.
- BOWLING, C. C. The stylet sheath as an indicator of feeding activity of the rice stink bug. **Journal of Economic Entomology**, v. 73, n. 1, p. 1-3, 1980.
- CERVANTES, F. A.; BACKUS, E. A.; GODFREY, L.; AKBAR, W.; CLARK, T. L. Characterization of an EPG waveform library for adult *Lygus lineolaris* and *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton squares. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, n. 5, p. 684-697, 2016.

CHAPMAN, R. F. **The insects**: structure and function. 4th Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 788 p.

DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Rostrum length, mandible serration, and food and salivary canals areas of selected species of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 4, p. 584-587, 2010.

HORI, K. Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. (Ed.). **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 11-36.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Electropenetrography (EPG): a breakthrough tool unveiling stink bug (Pentatomidae) feeding on plants. **Neotropical Entomology**, v. 47, n. 1, p. 6-18, 2018a.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. EPG monitoring of the Neotropical brown-stink bug, *Euschistus heros* (F.), on soybean pods: an electrical penetration graph-histology analysis. **Journal of Insect Science**, v. 18, n. 6, p. 1-14, 2018b.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* Dallas on corn seedlings: an EPG analysis at multiple input impedances and histology correlation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, n. 2, p. 160-171, 2017a.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Probing behavior of *Dichelops furcatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) on wheat plants characterized by electropenetrography (EPG) and histological studies. **Journal of Insect Science**, v. 17, n. 2, p. 1-15, 2017b.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, n. 2, p. 118-132, 2016.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, n. 2, p. 198-210, 2016.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, n. 4939, p. 1358-1359, 1964.

PANIZZI, A. R.; SILVA, F. A. C. Insect bioecology and nutrition for integrated pest management (IPM). In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 687-704.

SCOPUS. Disponível em: <<https://www.scopus.com>>. Acesso em: 1 mar. 2019.

SILVA, F. A. C.; SILVA, J. J.; DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 5, p. 386-390, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3 rd Sunderland, MA: Sinauer, 2004. 690 p.

TJALLINGII, W. F. Comparison of AC and DC systems for electronic monitoring of stylet penetration activities by homopterans. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Ed.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Lanham Entomological Society of America, 2000. p. 41-69.

TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, n. 2, p. 177-186, 1985.

TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, n. 3, p. 721-730, 1978.

WALKER, G. P. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Ed.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Lanham: Entomological Society of America, 2000. p. 14-40.

WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, v. 83, n. 5, p. 522-526, 1993.

WEB OF SCIENCE. Disponível em: <<https://www.webofknowledge.com>>. Acesso em: 1 mar. 2019.

Embrapa

Trigo

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**PÁTRIA AMADA
BRASIL**
GOVERNO FEDERAL

CGPE 15279